

Biosensor chip

Patent number: DE10015816
Publication date: 2001-10-18
Inventor: FREY ALEXANDER (DE); THEWES ROLAND (DE)
Applicant: INFINEON TECHNOLOGIES AG (DE)
Classification:
- **international:** G01N27/327; C12Q1/00; B01L3/00; G01N33/483
- **european:** G01N33/543K2B
Application number: DE20001015816 20000330
Priority number(s): DE20001015816 20000330

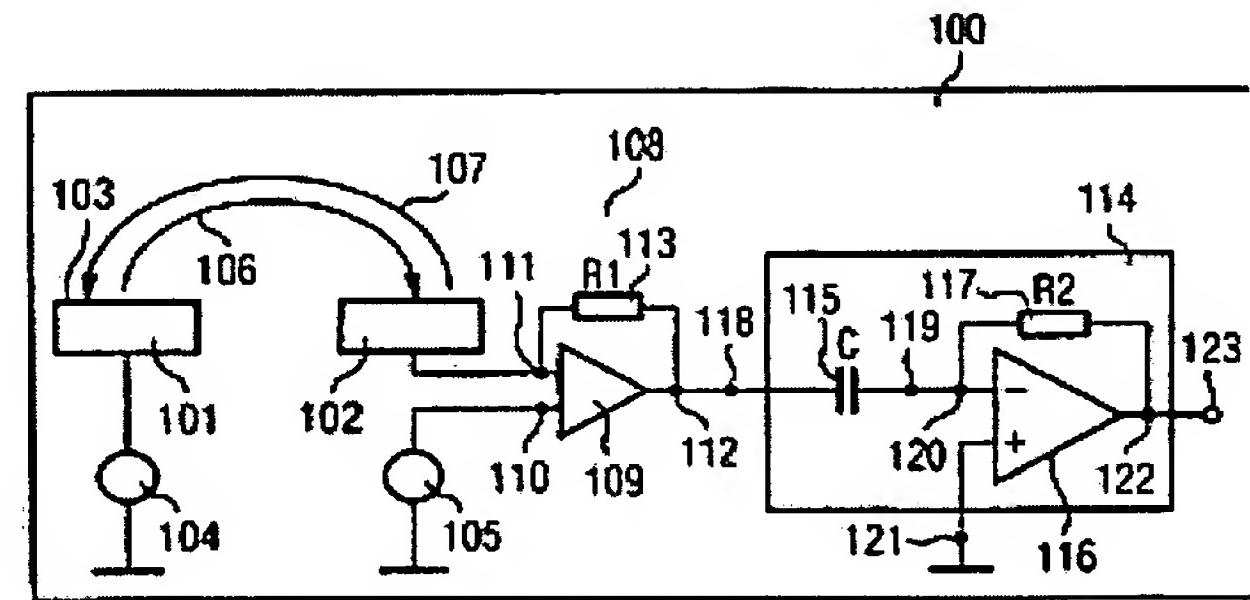
Also published as:

WO0175141 (A3)
WO0175141 (A2)
US2004014054 (A)

[Report a data error](#)

Abstract of DE10015816

The invention relates to a biosensor chip that is provided with a first electrode and a second electrode. The first electrode is provided with a holding area for holding probe molecules which can bind macromolecular biopolymers. The invention also relates to an integrated electric differentiating circuit by means of which an electric current can be detected and can be differentiated according to time, whereby said current is generated during a reduction/oxidation recycling procedure.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

⑩ DE 100 15 816 A 1

⑮ Int. Cl.⁷:
G 01 N 27/327
C 12 Q 1/00
B 01 L 3/00
G 01 N 33/483

⑯ Aktenzeichen: 100 15 816.1
⑯ Anmeldetag: 30. 3. 2000
⑯ Offenlegungstag: 18. 10. 2001

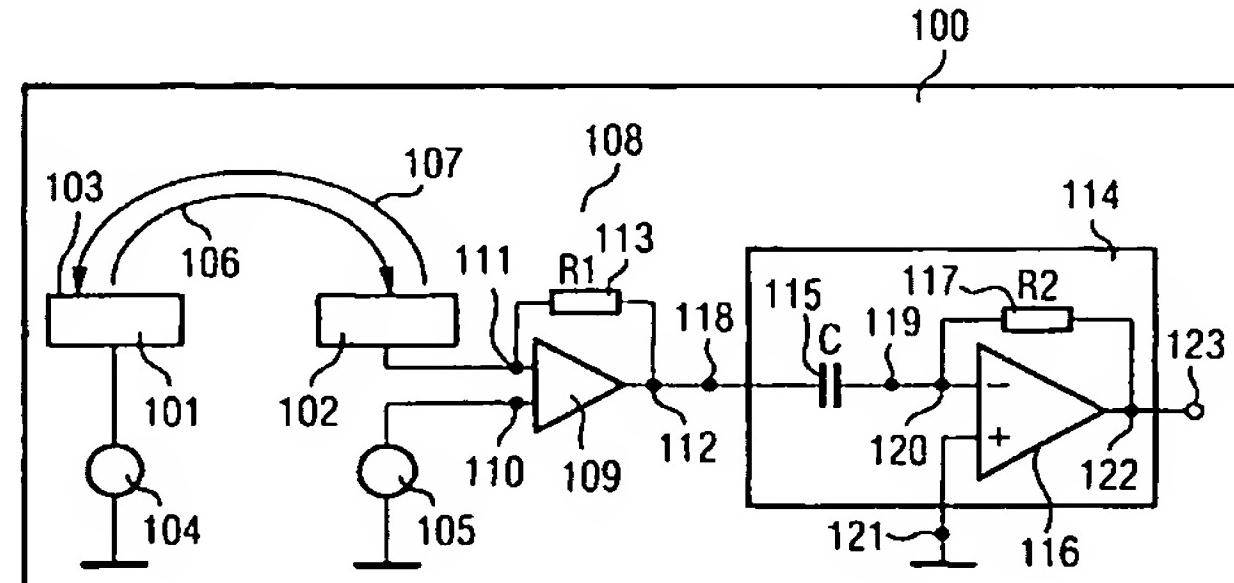
DE 100 15 816 A 1

⑯ Anmelder:
Infineon Technologies AG, 81669 München, DE
⑯ Vertreter:
Viering, Jentschura & Partner, 80538 München
⑯ Erfinder:
Frey, Alexander, 81735 München, DE; Thewes, Roland, Dr.-Ing., 82194 Gröbenzell, DE

⑯ Entgegenhaltungen:
DE 195 12 117 A1
US 53 84 028 A
WO 98 29 740 A1
WO 97 15 827 A1
WO 97 19 344 A 11
PAESCHKE, M. u.a.: Voltammetric Multichannel Measurements Using Silicon Fabricated Microelectrode Arrays. In: Electroanalysis 1996, 7, No. 1, S. 1-8;
HINTSCHE, R. u.a.: Microbiosensors using electrodes made in Sitechnology. In: SCHELLER, F. W. u.a. (Hrsg.): Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects. Basel (u.a.): Birkhäuser, 1997, S. 267-283;
GÖPEL, Wolfgang: Ultimate limits in the miniaturization of chemical sensors. In: Sensors and Actuators A 56 (1996), S. 83-102;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Biosensorchip
⑯ Der Biosensorchip weist eine erste Elektrode und eine zweite Elektrode auf. Die erste Elektrode weist einen Haltebereich zum Halten von Sondenmolekülen auf, die makromolekulare Biopolymere binden können. Weiterhin ist eine integrierte elektrische Differentiator-Schaltung vorgesehen, mit der ein während eines Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs erzeugter elektrischer Strom erfasst und nach der Zeit differenziert werden kann.



DE 100 15 816 A 1

DE 100 15 816 A 1

Beschreibung

- [0001] Ein solcher Biosensorchip ist aus [1] bekannt.
- [0002] Fig. 2a und Fig. 2b zeigen einen solchen Biosensorchip, wie er in [1] beschrieben ist. Der Sensor 200 weist 5 zwei Elektroden 201, 202 aus Gold auf, die in einer Isolatorschicht 203 aus Isolatormaterial eingebettet sind. An die Elektroden 201, 202 sind Elektroden-Anschlüsse 204, 205 angeschlossen, an denen das an der Elektrode 201, 202 anliegende elektrische Potential zugeführt werden kann. Die Elektroden 201, 202 sind als Planarelektroden angeordnet. Auf jeder Elektrode 201, 202 sind DNA-Sondenmoleküle 206 immobilisiert (vgl. Fig. 2a). Die Immobilisierung erfolgt gemäß der Gold-Schwefel-Kopplung. Auf den Elektroden 201, 202 ist das zu untersuchende Analyt, beispielsweise ein 10 Elektrolyt 207, aufgebracht.
- [0003] Sind in dem Elektrolyt 207 DNA-Stränge 208 mit einer Sequenz enthalten, die zu der Sequenz der DNA-Sondenmoleküle 206 komplementär ist, so hybridisieren diese DNA-Stränge 208 mit den DNA-Sondenmolekülen 206 (vgl. Fig. 2b).
- [0004] Eine Hybridisierung eines DNA-Sondenmoleküls 206 und eines DNA-Strangs 208 findet nur dann statt, wenn 15 die Sequenzen des jeweiligen DNA-Sondenmoleküls 206 und des entsprechenden DNA-Strangs 208 zueinander komplementär sind. Ist dies nicht der Fall, so findet keine Hybridisierung statt. Somit ist ein DNA-Sondenmolekül einer vorgegebenen Sequenz jeweils nur in der Lage einen bestimmten, nämlich den DNA-Strang mit jeweils komplementärer Sequenz zu binden, d. h. mit ihm zu hybridisieren.
- [0005] Findet eine Hybridisierung statt, so verändert sich, wie aus Fig. 2b ersichtlich, der Wert der Impedanz zwischen 20 den Elektroden 201 und 202. Diese veränderte Impedanz wird durch Anlegen einer Wechselspannung mit einer Amplitude von ungefähr 50 mV an die Elektroden-Anschlüsse 204, 205 und dem dadurch resultierenden Strom mittels eines angeschlossenen Messgeräts (nicht dargestellt) bestimmt.
- [0006] Im Falle einer Hybridisierung verringert sich der kapazitive Anteil der Impedanz zwischen den Elektroden 201, 202. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sowohl die DNA-Sondenmoleküle 206 als auch die DNA-Stränge 208, die 25 eventuell mit den DNA-Sondenmolekülen 206 hybridisieren, nicht-leitend sind und somit anschaulich die jeweilige Elektrode 201, 202 in gewissem Maße elektrisch abschirmen.
- [0007] Zur Verbesserung der Messgenauigkeit ist es aus [4] bekannt, eine Vielzahl von Elektrodenpaaren 201, 202 zu verwenden und diese parallel zu schalten, wobei diese anschaulich miteinander verzahnt angeordnet sind, so dass sich 30 eine sogenannte Interdigitalelektrode 300 ergibt. Die Abmessung der Elektroden und der Abstände zwischen den Elektroden liegen in der Größenordnung der Länge der zu detektierenden Moleküle, d. h. der DNA-Stränge 208 oder darunter, beispielsweise im Bereich von 200 nm und darunter.
- [0008] Weiterhin sind Grundlagen über einen Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgang zum Erfassen makromolekularer Biopolymere aus [2] und [3] bekannt. Das Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgang, im weiteren auch als Redox-Recycling-Vorgang bezeichnet, wird im weiteren anhand der Fig. 4a bis Fig. 4c näher erläutert.
- [0009] Fig. 4a zeigt einen Biosensorchip 400 mit einer ersten Elektrode 401 und einer zweiten Elektrode 402, die auf 35 einem Substrat 403 als Isolatorschicht aufgebracht sind.
- [0010] Auf der ersten Elektrode 401 aus Gold ist ein Haltebereich, ausgestaltet als Halteschicht 404, aufgebracht. Der Haltebereich dient zum Immobilisieren von DNA-Sondenmolekülen 405 auf der ersten Elektrode 401.
- [0011] Auf der zweiten Elektrode ist kein solcher Haltebereich vorgesehen.
- [0012] Sollen mittels des Biosensors 400 DNA-Stränge mit einer Sequenz, die komplementär ist zu der Sequenz der 40 immobilisierten DNA-Sondenmoleküle 405 erfasst werden, so wird der Sensor 400 mit einer zu untersuchenden Lösung 406, beispielsweise einem Elektrolyt, in Kontakt gebracht derart, dass in der zu untersuchenden Lösung 406 eventuell enthaltene DNA-Stränge mit der komplementären Sequenz zu der Sequenz der DNA-Sondenmoleküle 405 hybridisieren können.
- [0013] Fig. 4b zeigt den Fall, dass in der zu untersuchenden Lösung 406 die zu erfassenden DNA-Stränge 407 enthalten sind und mit die DNA-Sondenmoleküle 405 hybridisiert sind.
- [0014] Die DNA-Stränge 407 in der zu untersuchenden Lösung sind mit einem Enzym 408 markiert, mit dem es möglich ist, im weiteren beschriebene Moleküle in Teilmoleküle zu spalten.
- [0015] Üblicherweise ist eine erheblich größere Anzahl von DNA-Sondenmolekülen 405 vorgesehen, als zu ermittelnde DNA-Stränge 407 in der zu untersuchenden Lösung 406 enthalten sind.
- [0016] Nachdem die in der zu untersuchenden Lösung 406 eventuell enthaltenen, mit dem Enzym 408 mit den immobilisierten DNA-Sondenmolekülen 407 hybridisiert sind, erfolgt eine Spülung des Biosensorchips 400, wodurch die nicht hybridisierten DNA-Stränge entfernt werden und der Biosensorchip 400 von der zu untersuchenden Lösung 406 gereinigt wird.
- [0017] Dieser zur Spülung verwendeten Spülösung oder einer in einer weiteren Phase eigens zugeführten weiteren Lösung wird eine elektrisch ungeladene Substanz beigegeben, die Moleküle enthält, die durch das Enzym an den hybridisierten DNA-Strängen 407 gespalten werden können in ein erstes Teilmolekül 410 mit einer negativen elektrischen Ladung und in ein zweites Teilmolekül mit einer positiven elektrischen Ladung.
- [0018] Die negativ geladenen ersten Teilmoleküle 410 werden, wie in Fig. 4c gezeigt ist, zu der positiv geladenen Anode gezogen, d. h. zu der ersten Elektrode 401, wie durch den Pfeil 411 in Fig. 4c angedeutet ist.
- [0019] Die negativ geladenen ersten Teilmoleküle 410 werden an der ersten Elektrode 401, die als Anode ein positives elektrisches Potential aufweist, oxidiert und werden als oxidierte Teilmoleküle 413 an die negativ geladene Katode, d. h. die zweite Elektrode 402 gezogen, wo sie wieder reduziert werden. Die reduzierten Teilmoleküle 414 wiederum wandern zu der ersten Elektrode 401, d. h. zu der Anode.
- [0020] Auf diese Weise wird ein elektrischer Kreisstrom generiert, der proportional ist zu der Anzahl der jeweils durch die Enzyme 408 erzeugten Ladungsträger.
- [0021] Der elektrische Parameter, der bei dieser Methode ausgewertet wird, ist die Änderung des elektrischen Stroms dI/dt als Funktion der Zeit t , wie dies in dem Diagramm 800 in Fig. 8 schematisch dargestellt ist.

DE 100 15 816 A 1

[0022] Fig. 8 zeigt die Funktion des elektrischen Stroms I 801 abhängig von der Zeit t 802. Der sich ergebende Kurvenverlauf 803 weist einen Offsetstrom I_{offset} 804 auf, der unabhängig ist vom zeitlichen Verlauf.

[0023] Der Offsetstrom I_{offset} 804 wird durch parasitäre Anteile aufgrund von Nichtidealitäten des Biosensorchips 400 erzeugt.

[0024] Eine wesentliche Ursache für den Offsetstrom I_{offset} 804 liegt darin, dass die Bedeckung der ersten Elektrode 401 mit DNA-Sondenmolekülen 405 nicht ideal, d. h. nicht vollständig dicht erfolgt. 5

[0025] Im Falle einer vollständig dichten Bedeckung der ersten Elektrode 401 mit DNA-Sondenmolekülen 405 ergäbe sich aufgrund der sogenannten Doppelschichtkapazität, die durch die immobilisierten DNA-Sondenmoleküle 405 entsteht, zwischen der ersten Elektrode 401 und dem elektrisch leitenden Elektrolyt 406 nur eine rein kapazitive elektrische Kopplung. 10

[0026] Die nicht vollständige Bedeckung führt jedoch zu parasitären Strompfaden zwischen der ersten Elektrode 401 und der zu untersuchenden Lösung 406, die unter anderem auch ohmsche Anteile aufweisen.

[0027] Um jedoch den Oxidations-/Reduktions-Prozess zu ermöglichen, darf die Bedeckung der ersten Elektrode 401 mit dem DNA-Sonden-Molekülen 405 nicht vollständig sein, damit die elektrisch geladenen Teilmoleküle, d. h. die negativ geladenen ersten Teilmoleküle zu der ersten Elektrode 401 überhaupt angezogen werden. 15

[0028] Um andererseits eine möglichst große Sensitivität eines solchen Bio-Sensors zu erreichen, verbunden mit geringen parasitären Effekten, sollte die Bedeckung der ersten Elektrode 401 mit DNA-Sonden-Molekülen 405 möglichst dicht sein. 20

[0029] Um eine hohe Reproduzierbarkeit der mit einem solchen Bio-Sensor 400 bestimmten Messwerte zu erreichen, müssen beide Elektroden 401, 402 stets ein hinreichend großes Flächenangebot für den Oxidations-/Reduktions-Prozess im Rahmen des Redox-Recycling-Vorgangs bereitstellen. 25

[0030] Fig. 5 zeigt die Skizze des Biosensorchips 400 gemäß dem Stand der Technik und die messtechnische Bestimmung des Parameters dI/dt . Zur einfacheren Erläuterung ist in Fig. 5 symbolisch eine erste Spannungsquelle 501, die ein erstes elektrisches Potential V_1 der ersten Elektrode 401 zur Verfügung stellt, gezeigt, sowie eine zweite Spannungsquelle 502, die ein zweites elektrisches Potential V_2 der zweiten Elektrode 402 zur Verfügung stellt. 30

[0031] Ferner ist symbolisch mittels zweier Pfeile 503, 504 der elektrische Kreisstrom, der sich gemäß dem Redox-Recycling-Vorgang, wie oben erläutert wurde, einstellt, dargestellt.

[0032] Der sich ergebende Messstrom I , dessen zeitlicher Verlauf gegeben ist gemäß folgender Vorschrift:

$$I = I_{\text{offset}} + m \cdot t, \quad (1)$$

mit

$$m = \frac{dI}{dt}, \quad (2)$$

wobei mit

- I der jeweils zu einem Zeitpunkt erfasste Wert des Messstroms bezeichnet wird,
- I_{offset} der Offsetstrom bezeichnet wird,
- dI/dt die Differentiation des Kreisstroms nach der Zeit t bezeichnet wird, und
- t die Zeit bezeichnet wird,

liegt an einem externen elektrischen Anschluss 505 des Biosensorchips 400, der über eine elektrische Leitung 506 mit der zweiten Elektrode 402 gekoppelt ist, an und kann von dem Biosensorchip 400 extern abgegriffen werden. 40

[0033] Mit dem Biosensorchip 400 ist ein elektrisches Messgerät 507 über eine elektrische Leitung 508 gekoppelt. Das Messgerät 507 ist über eine weitere elektrische Leitung 509, beispielsweise einem elektrischen Kabel, mit einem elektronischen Speicher 510 zur Speicherung der abgegriffenen Werte des Messstroms I zu verschiedenen Zeitpunkten an dem elektrischen Anschluss 505 des Biosensorchips 400, gekoppelt. 45

[0034] Mit dem Speicher 510 ist weiterhin eine Auswerteeinheit 511 über eine elektrische Leitung 512 gekoppelt. In der Auswerteeinheit 511 werden die zu verschiedenen Zeitpunkten erfassten elektrischen Messströme I , die in dem Speicher 510 gespeichert wurden, ausgelesen und es wird die Steigung m des Kurvenverlaufs 503 des erfassten Messstroms I über die Zeit t ermittelt. In der Auswerteeinheit 511 wird anschaulich eine numerische Differentiation des erfassten Kreisstroms durchgeführt. 50

[0035] Der sich nunmehr ergebende Wert m wird an einem Ausgang 513 der Auswerteeinheit 511 zur Verfügung gestellt. 55

[0036] Aufgrund des Parameters m kann nunmehr mittels bekannter Verfahren auf die Anzahl der mit dem Enzym 408 markierten, hybridisierten DNA-Stränge auf der ersten Elektrode 401 geschlossen werden.

[0037] In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass üblicherweise der Offsetstrom I_{offset} sehr viel größer ist als die Änderung des Kreisstroms über die Zeit, das heißt, dass gilt: 60

$$I_{\text{offset}} \gg m \cdot t_{\text{mess}}, \quad (3)$$

wobei mit t_{mess} die gesamte Messzeit bezeichnet wird, während der der Kreisstrom mittels des Biosensorchips 400 ermittelt wird. 65

[0038] Es muss also mittels des Biosensorchips 400 im Rahmen eines Stromsignals mit einem großen absoluten Wert, das heißt dem Offsetstrom I_{offset} eine relativ dazu sehr kleine zeitabhängige Änderung mit hoher Genauigkeit gemessen werden.

DE 100 15 816 A 1

[0039] Damit ergeben sich hohe Anforderungen an das einzusetzende Messgerät 507.

[0040] Ferner besteht ein grundsätzlichen Problem darin, dass das Verfahren aufgrund der oben dargestellten Relation sehr empfindlich ist gegen Signalrauschen.

[0041] Eine Störung der Größenordnung

5 $m \cdot t_{mess}$,

(4)

I_{offset}

die wie oben ausgeführt, sehr klein sein kann, kann schon zum Verlust der Information, das heißt zu einer fehlerhaften

10 Auswertung und somit zu einem fehlerhaften Messergebnis führen.

[0042] Somit liegt der Erfundung das Problem zugrunde, einen Biosensorchip anzugeben, mit der die Steigung des zeitlichen Verlaufs des Kreisstroms im Rahmen des Redox-Recycling-Vorgangs mit erhöhter Zuverlässigkeit erfasst werden kann.

15 [0043] Das Problem wird durch den Biosensorchip mit den Merkmalen gemäß dem unabhängigen Patentanspruch gelöst.

[0044] Ein Biosensorchip weist eine erste Elektrode und eine zweite Elektrode auf. Die erste Elektrode weist einen Haltebereich zum Halten von Sondenmolekülen auf, die makromolekulare Biopolymere binden können. Die erste Elektrode und die zweite Elektrode sind derart ausgestaltet, dass an ihnen ein Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgang erfolgen kann. Ferner ist in dem Biosensorchip eine integrierte elektrische Differentiator-Schaltung integriert, mit der ein während des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs erzeugter elektrischer Strom erfasst und nach der Zeit differenziert werden kann.

[0045] Unter makromolekularen Biopolymeren sind beispielsweise Proteine oder Peptide oder auch DNA-Stränge einer jeweils vorgegebenen Sequenz zu verstehen.

25 [0046] Unabhängig davon, welche Art von makromolekularem Biopolymer in der zu untersuchenden Lösung erfasst werden soll kann das makromolekulare Biopolymer im voraus mit dem Enzym markiert werden.

[0047] Sollen als makromolekulare Biopolymere Proteine oder Peptide erfasst werden, so sind die immobilisierten Moleküle Liganden, beispielsweise Wirkstoffe mit einer möglichen Bindungsaktivität, die die erfassenden Proteine oder Peptide an die jeweilige Elektrode binden, auf der die entsprechenden Liganden angeordnet sind.

30 [0048] Als Liganden kommen Enzymagonisten oder Enzymantagonisten, Pharmazeutika, Zucker oder Antikörper oder irgendein Molekül in Betracht, das die Fähigkeit besitzt, Proteine oder Peptide spezifisch zu binden.

[0049] Werden als makromolekulare Biopolymere DNA-Stränge einer vorgegebenen Sequenz verwendet, die mittels des Biosensors erfasst werden sollen, so können mittels des Biosensors DNA-Stränge einer vorgegebenen Sequenz mit DNA-Sondenmolekülen mit der zu der Sequenz der immobilisierten DNA-Stränge komplementären Sequenz als Moleküle auf der ersten Elektrode hybridisiert werden.

35 [0050] Im Rahmen dieser Beschreibung ist unter einem Sondenmolekül sowohl ein Ligand als auch ein DNA-Sondenmolekül zu verstehen.

[0051] Der Haltebereich kann zum Halten von Sondenmolekülen ausgestaltet sein, mit denen Peptide oder Proteine gebunden werden können.

40 [0052] Alternativ kann der Haltebereich zum Halten von DNA-Sondenmolekülen ausgestaltet sein, mit denen DNA-Moleküle gebunden werden können.

[0053] Der Haltebereich kann zumindest eines der folgenden Materialien aufweisen:
Hydroxylreste, Epoxidreste, Aminreste, Acetoxyreste, Isocyanatreste, Succinimidylesterreste, Thiolreste, Gold, Silber, Platin, Titan.

45 [0054] Der Biosensorchip kann mit einer dritten Elektrode versehen sein, wobei die zweite und die dritte Elektrode in diesem Fall derart ausgestaltet sind, dass der Reduktions-/Oxidations-Prozess im Rahmen des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs an der zweiten Elektrode und an der dritten Elektrode erfolgt.

[0055] In diesem Zusammenhang kann die erste Elektrode ein erstes elektrisches Potential, die zweite Elektrode ein zweites elektrisches Potential und die dritte Elektrode ein drittes elektrisches Potential aufweisen. Das dritte elektrische Potential wird derart gewählt, dass während des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs die Reduktion oder Oxidation nur an der zweiten Elektrode und an der dritten Elektrode erfolgt.

[0056] Dies kann beispielsweise dadurch gewährleistet werden, dass das dritte elektrische Potential größer ist als das erste elektrische Potential und das erste elektrische Potential größer ist als das zweite elektrische Potential.

50 [0057] Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung können die Elektroden in einer Interdigitalelektrodenanordnung angeordnet sein, wobei die dritte Elektrode jeweils zwischen der ersten und der zweiten Elektrode angeordnet ist.

[0058] Ferner können die erste Elektrode und die zweite Elektrode und/oder die dritte Elektrode derart relativ zueinander angeordnet sein, dass sich zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode und/oder der dritten Elektrode im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien eines zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode und/oder der dritten Elektrode erzeugten elektrischen Feldes ausbilden können.

55 [0059] Gemäß einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung ist die Differentiator-Schaltung mit der zweiten Elektrode elektrisch gekoppelt. Die Differentiator-Schaltung kann über einen Strom-Spannungswandler mit der zweiten Elektrode gekoppelt sein.

[0060] Ferner kann auf dem Biosensorchip eine Referenzschaltung integriert sein, die den gleichen Aufbau aufweist wie die Differentiator-Schaltung, eventuell mit dem Strom-Spannungswandler. Mit der Referenzschaltung ist ein elektrisches Referenzsignal erzeugbar.

60 [0061] Mit der Referenzschaltung können Schwankungen der die Funktionalität und Dimensionierung der Differentiator-Schaltung bestimmenden Einheiten, insbesondere der elektrischen Widerstände und der Kapazität, die für verschiedene Chips und Wafer erheblich sein können, eine automatische Kalibrierung vorgenommen werden. Auf diese Weise wird die Qualität des erreichten Messergebnisses weiter erhöht.

DE 100 15 816 A 1

- [0062] Zum Herausfiltern des Rauschsignals kann ein Tiefpassfilter in der Referenzschaltung vorgesehen sein, wobei die Grenzfrequenz des Tiefpassfilters derart eingerichtet ist, dass zwar das hochfrequente Rauschsignal herausgefiltert wird, aber dennoch die entsprechende zeitliche Änderung des erfassten Kreisstroms im Rahmen der Differentiator-Schaltung mit berücksichtigt werden kann. 5
- [0063] Durch die Frequenzbandbegrenzung in der Referenzschaltung mittels des Tiefpasses wird eine weitere Steigerung der Robustheit des ermittelten Messergebnisses erreicht.
- [0064] Der Biosensorchip kann ferner eine Vielzahl erster Elektroden und eine Vielzahl zweiter Elektroden aufweisen, wobei die ersten und zweiten Elektroden als ein Elektroden-Array innerhalb des Biosensorchips angeordnet sind. 10
- [0065] Weiterhin kann eine Vielzahl dritter Elektroden vorgesehen sein, und als Elektroden-Array angeordnet sein, wobei die zweiten Elektroden und die dritten Elektroden derart ausgestaltet und angeordnet sind, dass das Reduktions-/Oxidations-Prozess im Rahmen eines Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs an den zweiten Elektroden und an den dritten Elektroden erfolgt. 15
- [0066] Anschaulich kann die Erfindung darin gesehen werden, dass die Differentiation des ermittelten Kreisstroms nicht mehr außerhalb des Chips erfasst wird, sondern dass eine On-Chip-Erfassung des sich ergebenden Kreisstroms bzw. dessen zeitlichen Verlaufs nunmehr erfasst werden kann mit größerer Robustheit verglichen mit dem Biosensorchip gemäß dem Stand der Technik. 15
- [0067] Hybridisieren viele mit dem Enzym markierten DNA-Stränge mit den immobilisierten DNA-Sondenmolekülen in einem kleinen Bereich, so sind entsprechend viele dieser Enzyme an diesem Bereich konzentriert und die Anstiegsrate des erzeugten Kreisstroms ist höher als in einem anderen Bereich, wo weniger mit dem Enzym markierte DNA-Stränge hybridisiert sind. Durch Vergleichen der Anstiegsraten zwischen verschiedenen Bereichen des Biosensors kann ermittelt werden, nicht nur ob DNA-Stränge in der zu untersuchenden Lösung mit den DNA-Sondenmolekülen einer vorgegebenen Sequenz hybridisieren, sondern auch wie gut, d. h. mit welcher Effizienz, die Hybridisierung gegenüber anderen DNA-Sondenmolekülen erfolgt. 20
- [0068] Mit anderen Worten ausgedrückt bedeutet dies, dass ein solcher Biosensorchip qualitative als auch quantitative Informationen über den DNA-Inhalt einer zu untersuchenden Lösung liefert. 25
- [0069] Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in den Figuren dargestellt und werden im Weiteren näher erläutert.
- [0070] Es zeigen
- [0071] Fig. 1 eine Skizze eines Biosensorchips gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- [0072] Fig. 2a und 2b eine Skizze zweier Planarelektroden, mittels derer die Existenz zu erfassender DNA-Stränge in einer zu untersuchenden Lösung (Fig. 2a) bzw. deren Nicht-Existenz (Fig. 2b) nachgewiesen werden können; 30
- [0073] Fig. 3 Interdigitalelektroden gemäß dem Stand der Technik.
- [0074] Fig. 4a bis 4c Skizzen eines Biosensorchips gemäß dem Stand der Technik, anhand derer einzelne Zustände im Rahmen des Redox-Recycling-Vorgangs erläutert werden;
- [0075] Fig. 5 eine Skizze, in der die Auswertung des Messstroms gemäß dem Stand der Technik dargestellt ist;
- [0076] Fig. 6a und 6b eine Skizze der Referenzschaltung (Fig. 6a) mit Bandbegrenzung und eines Bode-Diagramms, das die Bandbegrenzung zeigt gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung (Fig. 6b); und 35
- [0077] Fig. 7 eine Skizze des Biosensorchips gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung mit einer integrierten Referenzschaltung.
- [0078] Fig. 8 ein Funktionsverlauf eines Kreisstroms gemäß dem Stand der Technik im Rahmen eines Redox-Recycling-Vorgangs; 40
- [0079] Fig. 9 einen Biosensor gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- [0080] Fig. 10 einen Querschnitt eines Biosensors mit zwei Elektroden, die als Interdigitalelektrodenanordnung angeordnet sind;
- [0081] Fig. 11a bis 11d Querschnittsansichten einer Interdigitalelektrode in vier Verfahrenszuständen in einem Herstellungsverfahren eines Biosensors gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung; 45
- [0082] Fig. 12a bis 12c Querschnittsansichten eines Biosensors während einzelner Verfahrensschritte des Herstellungsverfahrens einer Elektrode des Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- [0083] Fig. 13a bis 13c Querschnittsansichten eines Biosensors während einzelner Verfahrensschritte des Herstellungsverfahrens einer Elektrode des Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- [0084] Fig. 14a bis 14c jeweils einen Querschnitt eines Biosensors zu verschiedenen Zeitpunkten während des Herstellungsverfahrens gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung; 50
- [0085] Fig. 15 eine Draufsicht eines Biosensor-Arrays gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung mit zylindrischen Elektroden;
- [0086] Fig. 16 eine Draufsicht eines Biosensor-Arrays gemäß einem Ausführungsbeispiel der Erfindung mit quaderförmigen Elektroden; 55
- [0087] Fig. 17 eine Querschnittsansicht eines Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- [0088] Fig. 18 eine Querschnittsansicht eines Biosensors gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung; und
- [0089] Fig. 19a bis 19g Querschnittsansichten eines Biosensors während einzelner Verfahrensschritte eines Herstellungsverfahrens gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung; 60
- [0090] Fig. 1 zeigt eine Planarelektrodenanordnung auf einem Biosensorchip 100 mit einer ersten Elektrode 101 und einer zweiten Elektrode 102, wobei auf der Oberfläche 103 der ersten Elektrode 101, wie aus [1] bekannt, ein Haltebereich zum Halten von DNA-Sondenmolekülen vorgesehen ist.
- [0091] Die erste Elektrode 101 und die zweite Elektrode 102 sind aus Gold hergestellt. 65
- [0092] Der ersten Elektrode 101 wird ein erstes elektrisches Potential V1 mittels einer ersten Spannungsquelle 104 zugeordnet.
- [0093] Der zweiten Elektrode 102 wird ein zweites elektrisches Potential V2 mittels einer zweiten Spannungsquelle 105 zugeordnet.

DE 100 15 816 A 1

[0094] Das erste elektrische Potential V1 und das zweite elektrische Potential V2 werden derart gewählt, dass sich gemäß dem Verfahren, welches im Zusammenhang mit dem Stand der Technik erläutert wurde, ein Reduktions-/Oxidations-Vorgang einstellt, wenn die Elektroden 101, 102 zuerst mit einer zu untersuchenden Lösung (nicht dargestellt), anschließend mit einer Spülösung, und schließlich mit einer Lösung mit einer Substanz in Kontakt gebracht wird, die Moleküle aufweist, die mittels eines Enzyms, das die hybridisierten DNA-Stränge markiert, die auf der ersten Elektrode 101 immobilisiert sind, gespalten werden.

5 [0095] Als Enzym können gemäß diesem Ausführungsbeispiel beispielsweise

- 10 – a-Galactosidase,
- b-Galactosidase,
- b-Glucosidase,
- a-Mannosidase,
- Alkaline Phosphatase,
- Acidic Phosphatase,
- 15 – Oligosaccharide Dehydrogenase,
- Glucose Dehydrogenase,
- Laccase,
- Tyrosinase,
- oder artverwandte Enzyme

20 verwendet werden.

[0096] Es ist anzumerken, dass niedermolekulare Enzyme die höchste Umsatzeffizienz und daher auch die höchste Empfindlichkeit gewährleisten können.

[0097] In der weiteren Lösung sind somit Moleküle enthalten, die durch das Enzym gespalten werden können in ein erstes Teilmolekül mit negativer elektrischer Ladung und in ein zweites Teilmolekül mit positiver elektrischer Ladung.

25 [0098] Als das spaltbare Molekül können vor allem beispielsweise

- 30 – p-Aminophenyl-hexopyranoside,
- p-Aminophenyl-phosphate,
- p-Nitrophenyl-hexopyranoside,
- p-Nitrophenyl-phosphate, oder
- geeignete Derivate von
 - a) Diaminen,
 - b) Catecholaminen,
 - c) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$,
 - d) Ferrocen,
 - e) Dicarboxylsäure,
 - f) Ferrocenlysin,
 - g) Osmiumbipyridyl-NH, oder
 - h) PEG-Ferrocen²

40 verwendet werden.

[0099] Der sich ergebende Kreisstrom, symbolisiert durch Richtungspfeile 106, 107 wird erfasst und mittels eines Strom-Spannungswandlers 108, der mit der zweiten Elektrode gekoppelt ist, in eine erste Ausgangsspannung $V_{\text{OUT}1}$ gewandelt.

45 [0100] Der Strom-Spannungswandler 108 weist einen ersten Operationsverstärker 109 auf, dessen nicht-invertierender Eingang 110 mit der zweiten Spannungsquelle 105 gekoppelt ist und dessen invertierender Eingang 111 mit der zweiten Elektrode 102 gekoppelt ist.

[0101] Der Ausgang 112 des ersten Operationsverstärkers 109 ist über einen ersten elektrischen Widerstand R1 113 an den invertierenden Eingang 111 des ersten Operationsverstärkers 109 rückgekoppelt.

[0102] Weiterhin ist der Ausgang 112 des ersten Operationsverstärkers 109 mit einer ebenfalls in dem Biosensorchip 100 integrierten Differentiator-Schaltung 114 gekoppelt.

[0103] Die Differentiator-Schaltung 114 weist einen Kondensator C 115, einen zweiten Operationsverstärker 116, sowie einen zweiten elektrischen Widerstand R2 117 auf.

55 [0104] Der Ausgang des ersten Operationsverstärkers 109 ist mit einem ersten Anschluss 118 des Kondensators C 115 gekoppelt.

[0105] Ein zweiter Anschluss 119 des Kondensators C 115 ist mit dem invertierenden Eingang 120 des zweiten Operationsverstärkers 116 gekoppelt.

[0106] Der nicht-invertierende Eingang 121 des zweiten Operationsverstärkers 116 ist mit dem Massepotential gekoppelt.

60 [0107] Der Ausgang 122 des zweiten Operationsverstärkers 116 ist über den zweiten elektrischen Widerstand R2 117 mit dem invertierenden Eingang 120 des zweiten Operationsverstärkers 116 gekoppelt.

[0108] Weiterhin ist der Ausgang 122 des zweiten Operationsverstärkers 116 mit einem externen elektrischen Anschluss 123 gekoppelt, an dem eine zweite Ausgangsspannung $V_{\text{OUT}2}$ von dem Biosensorchip 100 zur Verfügung gestellt wird.

65 [0109] Durch diese On-Chip-Lösung werden die Einflüsse von Rauschsignalen gering gehalten, was insbesondere aufgrund der Bestimmung der Steigung m

DE 100 15 816 A 1

$$m = \frac{dI}{dt} \quad (2)$$

aus dem von der zweiten Elektrode 102 erfassten Sensorsignal I_{Sensor} mit

5

$$I_{\text{Sensor}} = I_{\text{offset}} + m \cdot t \quad (5)$$

in unmittelbarer örtlicher Nähe der zweiten Elektrode 102 erfolgt.

[0110] Am Ausgang 112 des ersten Operationsverstärkers 109 liegt die erste Ausgangsspannung V_{OUT1} an, die sich gemäß folgender Vorschrift ergibt:

10

$$V_{\text{OUT1}} = (I_{\text{offset}} + m \cdot t) R1 + V2 \quad (6)$$

Ferner wird durch den Strom-Spannungswandler 108 in der vorliegenden Verschaltung gewährleistet, dass das zweite elektrische Potential $V2$ an der zweiten Elektrode 102 anliegt.

15

[0111] Die nachgeschaltete Differentiator-Schaltung 114 bewirkt, dass aufgrund der ersten Ausgangsspannung V_{OUT1} ein Ausgangssignal, das heißt die zweite Ausgangsspannung V_{OUT2} , gebildet wird, die zu der ermittelnden Steigung m proportional ist gemäß folgender Vorschrift:

20

$$V_{\text{OUT2}} = m \cdot C \cdot R1 \cdot R2. \quad (7)$$

[0112] Zur Ermittlung der Steigung m ist es somit erforderlich, dass die Werte der Kapazität C 115, des ersten elektrischen Widerstands $R1$ 113 und des zweiten elektrischen Widerstands $R2$ 117 bekannt sind.

25

[0113] Die Größen der Widerstände $R1$ 113, $R2$ 117 und der Kapazität C 115 können gemäß dem ersten Ausführungsbeispiel unmittelbar auf dem Biosensorchip 100 gemessen werden.

[0114] Auf diese Weise kann die Kalibrierung des Biosensorchips 100 und basierend darauf, die Messwerterfassung erfolgen.

30

[0115] Gemäß einer Ausgestaltung der Erfindung ist vor die Differentiator-Schaltung 114 eine Frequenzbandbegrenzung vorgeschaltet, beispielsweise realisiert mittels eines Tiefpasses.

[0116] Um jedoch möglichen Schwankungen der Größen bei für verschiedene Biosensorchips und unterschiedliche Wafer aufgrund sich verändernder Herstellungsbedingungen entgegenwirken zu können, ist es gemäß einem zweiten Ausführungsbeispiel vorgesehen, eine Referenzschaltung 600 (vgl. Fig. 6a) vorzusehen.

35

[0117] Die Referenzschaltung 600 weist den gleichen Aufbau auf wie die Differentiator-Schaltung 114, das heißt einen Kondensator C 601, einen Operationsverstärker 602, sowie einen elektrischen Widerstand R 603.

[0118] Ein erster Anschluss 604 des Kondensators ist mit dem invertierenden Eingang 605 des Operationsverstärkers 602 gekoppelt.

40

[0119] Der nicht-invertierende Eingang 606 des Operationsverstärkers 602 ist mit dem Massepotential gekoppelt.

[0120] Der Ausgang 607 des Operationsverstärkers 606 ist über den elektrischen Widerstand 603 mit dem invertierenden Eingang 605 des Operationsverstärkers 602 rückgekoppelt.

45

[0121] Zusätzlich weist die Referenzschaltung 600 optional, d. h. wenn der Differentiator-Schaltung 114 ein Tiefpassfilter vorgeschaltet ist, ein Tiefpassfilter 608 auf zum Herausfiltern hochfrequenter Signale, insbesondere der Rauschsignale.

[0122] Der Tiefpassfilter 608 ist mit seinem ersten Anschluss 609 mit dem Eingang 610 der Referenzschaltung 600 gekoppelt und mit seinem zweiten Anschluss 611 mit dem zweiten Anschluss 612 des Kondensators C 601.

50

[0123] Der Ausgang 607 des Operationsverstärkers 602 ist mit dem Ausgang 613 der Referenzschaltung 600 gekoppelt.

[0124] Fig. 6b zeigt ein Bode-Diagramm 620 der mittels des Tiefpasses 608 erreichten Tiefpassfilterung eines Eingangssignals V_{IN} zum Ermitteln eines Ausgangssignal V_{OUT} abhängig von einer Grenzfrequenz f_G des Tiefpassfilters 608.

55

[0125] Der Verlauf der Ausgangsspannung V_{OUT} abhängig von einer Frequenz f ist als Kurvenverlauf 621 schematisch in das Bode-Diagramm 620 eingezeichnet.

[0126] Fig. 7 zeigt den Biosensorchip 700 gemäß einer alternativen Ausführungsform mit der Referenzschaltung 600.

60

[0127] Wie in Fig. 7 dargestellt ist, ist die Referenzschaltung 600 in unmittelbarer örtlicher Nähe, das heißt in einer Entfernung von ungefähr einigen Mikrometern auf dem Biosensorchip 700 zu der Elektrodenanordnung und insbesondere zu der Differentiator-Schaltung 114 und dem Strom-Spannungswandler 108 angeordnet.

65

[0128] Mit dem Eingang 610 der Referenzschaltung 600 ist eine Stromquelle 701 gekoppelt, mit der ein Referenzstrom I_{ref} 702 der Referenzschaltung 600 zugeführt wird.

[0129] Der Referenzstrom I_{ref} 702 ergibt sich gemäß folgender Vorschrift:

$$I_{\text{ref}} = m_{\text{ref}} \cdot t. \quad (8)$$

60

[0130] Wie im weiteren erläutert wird, ist es aufgrund dieser alternativen Ausführungsform nicht mehr erforderlich, die Werte der Differentiator-Schaltung 114, das heißt des Kondensators 115 und des zweiten elektrischen Widerstands $R2$ 117 sowie den Wert des ersten elektrischen Widerstands $R1$ 113 des Strom-Spannungswandlers 108 zu messen.

65

[0131] Es ist darauf hinzuweisen, dass die Referenzschaltung 600 und die Differentiator-Schaltung 114 grundsätzlich identische Layouts aufweisen.

[0132] Am Ausgang 613 der Referenzschaltung 600 ergibt sich somit eine Referenz-Ausgangsspannung $V_{\text{OUT2, ref}}$ ge-

DE 100 15 816 A 1

mäß folgender Vorschrift:

$$V_{OUT2,ref} = m_{ref} \cdot C \cdot R1 \cdot R2. \quad (9)$$

5 [0133] Der Ausgang des Biochip-Sensors aus Fig. 1 123 ist mit einem ersten Anschluss 703 einer Auswerteeinheit 704 gekoppelt.

[0134] Ferner ist der Ausgang 613 der Referenzschaltung 600 mit einem zweiten Eingang 705 der Auswerteeinheit 704 gekoppelt.

[0135] In der Auswerteeinheit 704 wird die Steigung m gemäß folgender Vorschrift ermittelt:

$$10 m = m_{ref} \cdot \frac{V_{OUT2}}{V_{OUT2, ref}}. \quad (10)$$

[0136] Die zu ermittelnde Steigung m wird als Ausgangssignal der Auswerteeinheit 704 an dessen Ausgang 706 zur Verfügung gestellt.

[0137] Aus der Steigung m kann nunmehr auf bekannte Weise die Anzahl der hybridisierten, mit dem Enzym markierten DNA-Stränge, die mit den DNA-Sondenmolekülen auf der ersten Elektrode 101 hybridisiert sind, ermittelt werden.

[0138] Das Messinstrument zum Ermitteln des Ausgangssignals der Auswerteeinheit 704, die als Ausgangsspannung an dem Ausgang 706 der Auswerteeinheit 704 anliegt, kann nunmehr mittels eines einfachen Voltmeters aufgezeichnet werden.

[0139] Es ist darauf hinzuweisen, dass alternativ die Auswerteeinheit 704 ebenfalls in dem Biosensorchip 700 integriert sein kann.

[0140] Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die Erfindung nicht auf einen Biosensorchip zum Erfassen von DNA-Molekülen beschränkt ist, sondern es können durch entsprechende Änderung der ersten Elektrode 101, das heißt durch Immobilisieren von Liganden an der ersten Elektrode 101 auch andere makromolekulare Biopolymere erfasst werden, die mit dem Enzym markiert sind, wodurch ebenfalls ein Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgang erzielt werden kann, wie oben erläutert wurde.

[0141] Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die Erfindung nicht auf eine Planarelektrodenanordnung beschränkt ist.

[0142] Die Elektroden können in Form einer Interdigitalelektrodenanordnung, wie sie in [4] beschrieben ist, angeordnet sein.

[0143] Ferner können alternative Elektrodenkonfigurationen, wie sie im weiteren erläutert werden, auf dem Biosensorchip 100, 700, angeordnet sein.

[0144] Fig. 9 zeigt einen Biosensorchip 900 mit einer weiteren Elektrodenkonfiguration.

[0145] Der Biosensorchip 900 weist eine erste Elektrode 901 und eine zweite Elektrode 902 auf, die auf einer Isolatorschicht 903 derart angeordnet sind, dass die erste Elektrode 901 und die zweite Elektrode 902 voneinander elektrisch isoliert sind.

[0146] Die erste Elektrode 901 ist mit einem ersten elektrischen Anschluss 904 gekoppelt, und die zweite Elektrode 902 ist mit einem zweiten elektrischen Anschluss 905 gekoppelt.

[0147] Die Elektroden 901, 902 weisen eine quaderförmige Struktur auf, wobei sich eine erste Elektrodenfläche 906 der ersten Elektrode 901 und eine erste Elektrodenfläche 907 der zweiten Elektrode 902 im wesentlichen parallel zueinander ausgerichtet gegenüberstehen.

[0148] Dies wird dadurch erreicht, dass gemäß diesem Ausführungsbeispiel die Elektroden 901, 902 im wesentlichen bezüglich der Oberfläche 108 der Isolatorschicht 903 senkrechte Seitenwände 906, 907 aufweisen, welche die erste Elektrodenfläche 906 der ersten Elektrode 901 bzw. die erste Elektrodenfläche 907 der zweiten Elektrode 902 bilden.

[0149] Wird ein elektrisches Feld zwischen der ersten Elektrode 901 und der zweiten Elektrode 902 angelegt, so wird durch die sich im wesentlichen parallel zueinander ausgerichteten Elektrodenflächen 906, 907 ein Feldlinienverlauf mit Feldlinien 909 erzeugt, die zwischen den Oberflächen 906, 907 im wesentlichen ungebremmt sind.

[0150] Gekrümmte Feldlinien 910 ergeben sich lediglich zwischen einer zweiten Elektrodenfläche 911 der ersten Elektrode 901 und einer zweiten Elektrodenfläche 912 der zweiten Elektrode 902, die jeweils für die Elektroden 901, 902 die oberen Oberflächen bilden, sowie in einem Randbereich 913 zwischen den Elektroden 901, 902.

[0151] Die ersten Elektrodenflächen 906, 907 der Elektroden 901, 902 sind als Haltebereiche zum Halten von Sondenmolekülen, die makromolekulare Biopolymere, die mittels des Biosensors 900 zu erfassen sind, binden können.

[0152] Die Elektroden 901, 902 sind gemäß diesem Ausführungsbeispiel aus Gold hergestellt.

[0153] Es werden kovalente Verbindungen zwischen den Elektroden und den Sondenmolekülen hergestellt, wobei der Schwefel zum Bilden einer Gold-Schwefel-Kopplung in Form eines Sulfids oder eines Thiols vorhanden ist.

[0154] Für den Fall, dass als Sondenmoleküle DNA-Sondenmoleküle verwendet werden, sind solche Schwefelfunktionalitäten Teil eines modifizierten Nukleotids, das mittels der sogenannten Phosphoramiditchemie während eines automatisierten DNA-Syntheseverfahrens am 3'-Ende oder am 5'-Ende des zu immobilisierenden DNA-Strangs eingebaut wird. Das DNA-Sondenmolekül wird somit an seinem 3'-Ende oder an seinem 5'-Ende immobilisiert.

[0155] Für den Fall, dass als Sondenmoleküle Liganden verwendet werden, werden die Schwefelfunktionalitäten durch ein Ende eines Alkyllinkers oder eines Alkylenlinkers gebildet, dessen anderes Ende eine für die kovalente Verbindung des Liganden geeignete chemische Funktionalität aufweist, beispielsweise einen Hydroxylrest, einen Acetoxyrest oder einen Succinimidylesterrest.

[0156] Die Elektroden, d. h. insbesondere die Haltebereiche werden beim Messeinsatz mit einem Elektrolyt 914, allgemein mit einer zu untersuchenden Lösung, bedeckt.

[0157] Befinden sich in der zu untersuchenden Lösung 914 die zu erfassenden makromolekularen Biopolymere, beispielsweise zu erfassende DNA-Stränge mit einer vorgegebenen Sequenz, die mit den immobilisierten DNA-Sondenmolekülen auf den Elektroden hybridisieren können, so hybridisieren die DNA-Stränge mit den DNA-Sondenmolekülen.

DE 100 15 816 A 1

[0158] Sind in der zu untersuchenden Lösung 914 keine DNA-Stränge mit der zu der Sequenz der DNA-Sondenmolekülen komplementären Sequenz enthalten, so können keine DNA-Strängen aus der zu untersuchenden Lösung 914 mit den DNA-Sondenmolekülen auf den Elektroden 901, 902 hybridisieren.

[0159] Zwischen den Elektroden 901, 902 wird, wie oben erläutert wurde, ein Redox-Recycling-Vorgang gestartet werden und dadurch die Anzahl der markierten hybridisierten DNA-Stränge, allgemein der markierten gebundenen makromolekularen Biopolymere ermittelt werden. 5

[0160] Fig. 10 zeigt einen Biosensor 1000 mit einer weiteren Elektrodenkonfiguration gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung.

[0161] Bei dem Biosensor 1000 sind in gleicher Weise wie bei dem Biosensor 900 gemäß dem in Fig. 9 gezeigten Ausführungsbeispiel zwei Elektroden 901, 902 vorgesehen, die auf der Isolatorschicht 903 aufgebracht sind. 10

[0162] Im Unterschied zu dem Biosensor 900 mit lediglich zwei quaderförmigen Elektroden sind die zwei Elektroden gemäß dem in Fig. 10 dargestellten Biosensor 900 als eine Vielzahl von jeweils abwechselnd angeordneten, parallel geschalteten Elektroden in Form der bekannten Interdigitalelektrodenanordnung angeordnet.

[0163] Fig. 10 zeigt zur weiteren Veranschaulichung ferner ein schematisches elektrisches Ersatzschaltbild, das in die Darstellung des Biosensors 1000 eingezeichnet ist. 15

[0164] Da sich zwischen den im wesentlichen sich parallel gegenüberstehenden Elektrodenflächen 906, 907 der Elektroden 901, 902, wie in Fig. 9 dargestellt wurde, im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien bezüglich der Oberfläche 908 der Isolatorschicht 903 ergeben, überwiegt der Anteil der durch die ungekrümmten Feldlinien erzeugten ersten Kapazität 1002 und des ersten Leitwerts 1003 verglichen mit der zweiten Kapazität 1004 und des zweiten Leitwerts 1005, die durch die gekrümmten Feldlinien 910 erzeugt werden. 20

[0165] Dieser erheblich größerer Anteil der ersten Kapazität 1002 und des ersten Leitwerts 1003 an dem Gesamtleitwert, der sich aus der Summe der ersten Kapazität 1002 und der zweiten Kapazität 1004 sowie des ersten Leitwerts 1003 und des zweiten Leitwerts 1005 ergeben, führt dazu, dass die Sensitivität des Biosensors 1000 bei Änderung des Zustandes des Biosensors 1000, d. h. bei Hybridisierung von DNA-Strängen in der zu untersuchenden Lösung 914 mit auf den Haltebereichen auf den Elektrodenflächen 906, 907 immobilisierten DNA-Sondenmolekülen 1001 erheblich erhöht wird. 25

[0166] Somit ist anschaulich bei gleichen lateralen Abmessungen der Elektroden 901, 902 und bei gleichen Abmessungen des zuvor eingeführten aktiven Bereichs, d. h. bei gleicher Fläche der Haltebereiche auf den Elektrodenflächen ein wesentlich größerer Anteil von Feldlinien eines angelegten elektrischen Feldes zwischen den Elektroden 901, 902 in dem Volumen enthalten, in dem die Hybridisierung stattfindet, wenn die zu erfassenden DNA-Stränge in der zu untersuchenden Lösung 914 enthalten sind als bei einer Planarelektrodenanordnung. 30

[0167] In anderen Worten bedeutet dies, dass die Kapazität der erfindungsgemäßen Anordnung pro Chipfläche deutlich größer ist als die Kapazität pro Chipfläche bei einer Planarelektrodenanordnung.

[0168] Im weiteren werden einige Alternativenmöglichkeiten zur Herstellung einer quaderförmigen Sensorelektrode mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden erläutert. 35

Erstes Verfahren zum Herstellen von Metallelektroden mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden, die Sondenmoleküle immobilisieren können

[0169] Fig. 11a zeigt ein Siliziumsubstrat 1100, wie es für bekannte CMOS-Prozesse hergestellt wird. 40

[0170] Auf dem Siliziumsubstrat 1100, in dem sich bereits integrierte Schaltungen und/oder elektrische Anschlüsse für die zu bildenden Elektroden befinden, wird eine Isolatorschicht 1101, die auch als Passivierungsschicht dient, in ausreichender Dicke, gemäß dem Ausführungsbeispiel in einer Dicke von 500 nm, mittels eines CVD-Verfahrens aufgebracht.

[0171] Die Isolatorschicht 1101 kann aus Siliziumoxid SiO_2 oder Siliziumnitrid Si_3N_4 hergestellt sein.

[0172] Die Interdigitalanordnung des Biosensors 1000 gemäß dem oben dargestellten Ausführungsbeispiel wird mittels Photolithographie auf der Isolatorschicht 1101 definiert. 45

[0173] Anschließend werden mittels eines Trockenätzverfahrens, z. B. dem Reactive Ion Etching (RIE), in der Isolatorschicht 1101 Stufen 1102 erzeugt, d. h. geätzt, gemäß dem Ausführungsbeispiel in einer Mindesthöhe 1103 von ungefähr 100 nm.

[0174] Die Höhe 1103 der Stufen 1102 muss ausreichend groß sein für einen anschließenden selbstjustierenden Prozess zum Bilden der Metallelektrode. 50

[0175] Es ist darauf hinzuweisen, dass zum Auftragen der Isolatorschicht 1101 alternativ auch ein Aufdampfverfahren oder ein Sputterverfahren eingesetzt werden kann.

[0176] Bei der Strukturierung der Stufen 1102 ist zu beachten, dass die Flanken der Stufen 1102 ausreichend steil sind, so dass sie hinreichend scharfe Kanten 1105 bilden. Ein Winkel 1106 der Stufenflanken gemessen zur Oberfläche der Isolatorschicht 1101 sollte gemäß dem Ausführungsbeispiel mindestens 50 grad betragen. 55

[0177] In einem weiteren Schritt wird eine Hilfsschicht 1104 (vgl. Fig. 11b) der Dicke von ungefähr 10 nm aus Titan auf die stufenförmige Isolatorschicht 1101 aufgedampft.

[0178] Die Hilfsschicht 1104 kann Wolfram, und/oder Nickel-Chrom, und/oder Molybdän aufweisen.

[0179] Es ist zu gewährleisten, dass die in einem weiteren Schritt aufgetragene Metallschicht, gemäß dem Ausführungsbeispiel eine Metallschicht 1107 aus Gold, an den Kanten 1105 der Stufen 1102 derart porös aufwächst, dass es möglich ist, in einem weiteren Verfahrensschritt an den Stufenübergängen jeweils eine Spalte 1108 in die ganzflächig aufgetragene Goldschicht 1107 zu ätzen. 60

[0180] In einem weiteren Verfahrensschritt wird die Goldschicht 1107 für den Biosensor 1000 aufgebracht.

[0181] Gemäß dem Ausführungsbeispiel weist die Goldschicht eine Dicke von ungefähr 500 nm bis ungefähr 2000 nm auf. 65

[0182] Es ist hinsichtlich der Dicke der Goldschicht 1107 lediglich zu gewährleisten, dass die Dicke der Goldschicht 1107 ausreichend ist, so dass die Goldschicht 1107 porös kolumnar aufwächst.

DE 100 15 816 A 1

- [0183] In einem weiteren Schritt werden Öffnungen 1108 in die Goldschicht 1107 geätzt, so dass sich Spalten ausbilden.
- [0184] Zum Nassätzen der Öffnungen wird eine Ätzlösung aus 7,5 g Super Strip 100TM (Markenname der Firma Lea Ronal GmbH, Deutschland) und 20 g KCN in 1000 ml Wasser H₂O verwendet.
- 5 [0185] Durch das kolumnare Wachstum des Goldes, allgemein des Metalls, während des Aufdampfens auf die Haftschiht 1104 wird ein anisotroper Ätzangriff erzielt, so dass der Oberflächenabtrag des Goldes ungefähr im Verhältnis 1 : 3 erfolgt.
- [0186] Durch das Ätzen der Goldschicht 1107 werden die Spalten 1108 abhängig von der Zeitdauer des Ätzvorgangs gebildet.
- 10 [0187] Dies bedeutet, dass die Zeitdauer des Ätzprozesses die Basisbreite, d. h. den Abstand 1109 zwischen den sich ausbildenden Goldelektroden 1110, 1111 bestimmt.
- [0188] Nachdem die Metallelektronen eine ausreichende Breite aufweisen und der Abstand 1109 zwischen den sich bildenden Goldelektroden 1110, 1111 erreicht sind, wird das Nassätzen beendet.
- 15 [0189] Es ist anzumerken, dass aufgrund des porösen Aufdampfens das Ätzen in zu der Oberfläche der Isolatorschicht 1101 parallelen Richtung wesentlich schneller erfolgt als in zu der Oberfläche der Isolatorschicht 1101 senkrechten Richtung.
- [0190] Es ist darauf hinzuweisen, dass alternativ zu einer Goldschicht auch andere Edelmetalle, wie beispielsweise Platin, Titan oder Silber verwendet werden können, da diese Materialien ebenfalls Haltebereiche aufweisen können bzw. mit einem geeigneten Material beschichtet werden können zum Halten von immobilisierten DNA-Sondenmolekülen oder allgemein zum Halten von Sondenmolekülen, und ein kolumnares Wachstum beim Aufdampfen aufweisen.
- 20 [0191] Für den Fall, dass die Haftschiht 1104 in den geöffneten Spalten 1112 zwischen den Metallelektronen 1110, 1111 entfernt werden soll, erfolgt dies ebenfalls selbstjustierend, indem man die Goldelektroden 1110, 1111 als Ätzmase verwendet.
- [0192] Gegenüber den bekannten Interdigitalelektronen weist die Struktur gemäß diesem Ausführungsbeispiel insbesondere den Vorteil auf, dass durch das selbstjustierende Öffnen der Goldschicht 1107 über den Kanten 1105 der Abstand zwischen den Elektroden 1110, 1111 nicht an eine minimale Auflösung des Herstellungsprozesses gebunden ist, d. h. der Abstand 1109 zwischen den Elektroden 1110, 1111 kann sehr schmal gehalten werden.
- [0193] Somit ergibt sich gemäß diesem Verfahren der Biosensor 1000 gemäß dem in Fig. 10 dargestellten Ausführungsbeispiel mit den entsprechenden Metallelektronen.
- 30 Zweites Verfahren zur Herstellung von Metallelektronen mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden, die Sondenmoleküle immobilisieren können
- [0194] Bei dem in den Fig. 12a bis Fig. 12c dargestellten Herstellungsverfahren wird von einem Substrat 1201 ausgegangen, beispielsweise von einem Silizium-Substrat-Wafer (vgl. Fig. 12a), auf dem bereits eine Metallisierung 1202 als elektrischer Anschluss vorgesehen ist, wobei auf dem Substrat 1201 schon eine Ätzstoppschicht 1203 aus Siliziumnitrid Si₃N₄ aufgebracht ist.
- [0195] Auf dem Substrat wird eine Metallschicht 1204, gemäß dem Ausführungsbeispiel eine Goldschicht 1204 aufgebracht mittels eines Aufdampfverfahrens.
- 40 [0196] Alternativ kann ein Sputterverfahren oder ein CVD-Verfahren zum Aufbringen der Goldschicht 1204 auf die Ätzstoppschicht 1203 eingesetzt werden.
- [0197] Allgemein weist die Metallschicht 1204 das Metall auf, aus dem die zu bildende Elektrode gebildet werden soll.
- [0198] Auf der Goldschicht 1204 wird eine elektrisch isolierende Hilfsschicht 1205 aus Siliziumoxid SiO₂ mittels eines CVD-Verfahrens (alternativ mittels eines Aufdampfverfahrens oder eines Sputterverfahrens) aufgebracht.
- 45 [0199] Durch Einsatz der Photolithographie-Technologie wird eine Lackstruktur aus einer Lackschicht 1206 gebildet, beispielsweise eine quaderförmige Struktur, welche der Form der zu bildenden Elektrode entspricht.
- [0200] Soll ein im weiteren beschriebenes Biosensor-Array mit einer Vielzahl von Elektroden erzeugt werden, wird mittels der Photolithographie eine Lackstruktur erzeugt, die in ihrer Form der zu bildenden Elektroden entsprechen, die das Biosensor-Array bilden.
- 50 [0201] In anderen Worten ausgedrückt bedeutet dies, dass die lateralen Abmessungen der gebildeten Lackstruktur den Abmessungen der zu erzeugenden Sensorelektrode entsprechen.
- [0202] Nach Aufbringen der Lackschicht 1206 und der entsprechenden Belichtung, die die entsprechenden Lackstrukturen vorgibt, wird die Lackschicht in den nicht "entwickelten", d. h. nicht belichteten Bereichen beispielsweise mittels Veraschen oder nasschemisch entfernt.
- 55 [0203] Auch wird die Hilfsschicht 1205 in den nicht durch die Photolackschicht 1206 geschützten Bereichen mittels eines Nassätzverfahrens oder Trockenätzverfahrens entfernt.
- [0204] In einem weiteren Schritt wird nach Entfernen der Lackschicht 1206 über der übrig gebliebenen Hilfsschicht 1205 eine weitere Metallschicht 1207 als Elektrodenschicht derart konform aufgebracht, dass die Seitenflächen 1208, 1209 der restlichen Hilfsschicht 1205 mit dem Elektrodenmaterial, gemäß dem Ausführungsbeispiel mit Gold, bedeckt sind (vgl. Fig. 12b).
- 60 [0205] Das Aufbringen kann mittels eines CVD-Verfahrens oder eines Sputterverfahrens oder mit einem Ion-Metal-Plasma-Verfahren erfolgen.
- [0206] In einem letzten Schritt (vgl. Fig. 12c) wird eine Spacer-Ätzung durchgeführt, bei der durch gezieltes Überätzen der Metallschichten 1204, 1207 die gewünschte Struktur der Elektrode 1210 gebildet wird.
- 65 [0207] Die Elektrode 1210 weist somit die nicht in dem Ätzschritt des Ätzens der Metallschichten 1204, 1207 weggeätzten Spacer 1211, 1212 auf sowie den unmittelbar unter der restlichen Hilfsschicht 1205 angeordneten Teil der ersten Metallschicht 1204, der mittels des Ätzverfahrens nicht weggeätzt worden ist.
- [0208] Die Elektrode 1210 ist mit dem elektrischen Anschluss, d. h. der Metallisierung 1202 elektrisch gekoppelt.

DE 100 15 816 A 1

[0209] Die Hilfsschicht 1205 aus Siliziumoxid kann bei Bedarf durch eine weitere Ätzung, beispielsweise im Plasma oder nasschemisch, mittels eines Verfahrens entfernt werden, bei dem Selektivität zur Ätzstoppeschicht 1203 gegeben ist.
[0210] Diese ist beispielsweise gewährleistet, wenn die Hilfsschicht 1205 aus Siliziumoxid besteht und die Ätzstoppeschicht 1203 Siliziumnitrid aufweist.

[0211] Die Steilheit der Wände der Elektrode in dem Biosensorchip 900, 1000, repräsentiert durch den Winkel 1213 zwischen den Spacer 1211, 1212 und der Oberfläche 1214 der Ätzstoppeschicht 1203, wird somit durch die Steilheit Flanken der restlichen Hilfsschicht 1205, d. h. insbesondere der Steilheit der Lackflanken 1215, 1216 der strukturierten Lackschicht 1206 bestimmt.

Drittes Verfahren zur Herstellung von Metallelektroden mit im wesentlichen senkrechten Seitenwänden, die Sondenmoleküle immobilisieren können 10

[0212] In den Fig. 13a bis Fig. 13c ist eine weitere Möglichkeit zum Herstellen einer Elektrode mit im wesentlichen senkrechten Wänden dargestellt.

[0213] Wiederum wird wie bei dem zweiten Beispiel zum Herstellen einer Elektrode dargestellt, von einem Substrat 1301 ausgegangen, auf dem bereits eine Metallisierung 1302 für den elektrischen Anschluss der zu bildenden Elektrode des Biosensors vorgesehen ist.

[0214] Auf dem Substrat 1301 aus Silizium wird eine Metallschicht 1303 als Elektrodenschicht aufgedampft, wobei die Metallschicht 1303 das für die Elektrode zu verwendende Material aufweist, gemäß diesem Ausführungsbeispiel Gold.

[0215] Alternativ zu dem Aufdampfen der Metallschicht 1303 kann die Metallschicht 1303 auch mittels eines Sputterverfahrens oder mittels eines CVD-Verfahrens auf dem Substrat 1301 aufgebracht werden.

[0216] Auf der Metallschicht 1303 wird eine Photolackschicht 1304 aufgebracht und mittels Photolithographie-Technologie derart strukturiert, dass eine Lackstruktur entsteht, die nach Entwickeln und Entfernen der entwickelten Bereiche den lateralen Abmessungen der zu bildenden Elektrode bzw. allgemein des zu bildenden Biosensor-Arrays entspricht.

[0217] Die Dicke der Photolackschicht 1304 entspricht im wesentlichen der Höhe der zu erzeugenden Elektroden.

[0218] Bei einer Strukturierung in einem Plasma mit Prozessgasen, die zu keiner Reaktion des Elektrodenmaterials führen können, insbesondere in einem Inertgas-Plasma, beispielsweise mit Argon als Prozessgas, erfolgt der Abtrag des Materials gemäß diesem Ausführungsbeispiel mittels physikalischem Sputter-Abtrag.

[0219] Dabei wird das Elektrodenmaterial aus der Metallschicht 1303 in einem Redepositionsprozess an die im wesentlichen senkrechten Seitenwände 1305, 1306 der strukturierten, nach Veraschen der entwickelten Lackstruktur nicht entfernten Lackelemente gesputtert, wo es keinem weiteren Sputterangriff mehr ausgesetzt ist.

[0220] Eine Redeposition von Elektrodenmaterial auf die Lackstruktur schützt die Lackstruktur vor weiterem Abtrag.

[0221] Aufgrund des Sputterns bilden sich an den Seitenwänden 1305, 1306 der Lackstruktur Seitenschichten 1307, 1308 aus dem Elektrodenmaterial, gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Gold.

[0222] Die Seitenschichten 1307, 1308 sind elektrisch mit einem nicht entfernten Teil 1309 der Metallschicht 1303, der sich unmittelbar unterhalb der restlichen Lackstruktur 1306 befindet, gekoppelt sowie ferner mit der Metallisierung 1303 (vgl. Fig. 13b).

[0223] In einem letzten Schritt (vgl. Fig. 13c) wird die Lackstruktur 1306, d. h. der Photolack, der sich in dem durch die Seitenschichten 1307, 1308 sowie die übrig gebliebene Metallschicht 1309 gebildeten Volumen befindet, mittels Veraschen oder nasschemisch entfernt.

[0224] Ergebnis ist die in Fig. 13c dargestellte Elektrodenstruktur 1310, die gebildet wird mit den Seitenwänden 1307, 1308 sowie dem nicht entfernten Teil 1309, der den Boden der Elektrodenstruktur bildet und mit der Metallisierung 1303 elektrisch gekoppelt ist.

[0225] Wie auch im vorangegangenen dargestellten Herstellungsverfahren wird die Steilheit der Seitenwände 1307, 1308 der gebildeten Elektrode bei diesem Verfahren durch die Steilheit der Lackflanken 1305, 1306 bestimmt.

[0226] In den Fig. 14a bis Fig. 14c ist ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit zylinderförmigen, auf dem Substrat senkrecht hervortretenden Elektroden dargestellt.

[0227] Zur Herstellung des Biosensors 1400 mit zylinderförmigen Elektroden, die im wesentlichen senkrecht auf einem Substrat 1401 aus Siliziumoxid angeordnet sind, wird eine Metallschicht 1402 als Elektrodenschicht aus dem gewünschten Elektrodenmaterial, gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Gold, mittels aufgebracht eines Aufdampf-Verfahrens.

[0228] Auf der Metallschicht 1402 wird eine Photolackschicht aufgebracht und die Photolackschicht wird mittels einer Maske belichtet derart, dass sich nach Entfernen der nicht belichteten Bereiche die in Fig. 14a dargestellte zylinderförmige Struktur 1403 auf der Metallschicht 1402 ergibt.

[0229] Die zylinderförmige Struktur 1403 weist einen Photoresist-Torus 1404 sowie ein zylinderförmiger Photoresist-Ring 1405 auf, die konzentrisch um den Photoresist-Torus 1404 angeordnet ist.

[0230] Zwischen dem Photoresist-Torus 1404 und dem Photoresist-Ring 1405 wird der Photolack entfernt, beispielsweise mittels Veraschens oder nasschemisch.

[0231] Durch Einsatz eines Sputterverfahrens wird, wie im Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Verfahren zur Herstellung einer Elektrode, mittels eines Redepositionsprozess, eine Metallschicht 1406 um den Photolack-Torus 1404 aufgetragen.

[0232] In gleicher Weise bildet sich eine innere Metallschicht 1407 um den Photoresist-Ring 1405 (vgl. Fig. 14b).

[0233] In einem weiteren Schritt wird das strukturierte Photolack-Material mittels Veraschen oder nasschemisch entfernt, so dass zwei zylinderförmige Elektroden 1408, 1409 gebildet werden.

[0234] Das Substrat 1401 wird in einem letzten Schritt so weit entfernt, beispielsweise mittels eines zu dem Elektrodenmaterial selektiven Plasma-Ätzprozesses, dass die Metallisierungen in dem Substrat freigelegt sind und mit den zylinderförmigen Elektroden elektrisch koppeln.

DE 100 15 816 A 1

- [0235] Die innere zylinderförmige Elektrode 1408 ist somit mit einem ersten elektrischen Anschluss 1410 elektrisch gekoppelt und die äußere zylinderförmige Elektrode 1409 ist elektrisch gekoppelt mit einem zweiten elektrischen Anschluss 1411.
- [0236] Die restliche Metallschicht 1402, die durch das Sputtern zwischen den zylinderförmigen Elektroden 1408, 1409 noch nicht entfernt wurde, wird in einem letzten Schritt mittels eines Sputter-Ätzprozesses entfernt. Ebenso wird die Metallschicht 1402 auf diese Weise entfernt.
- [0237] Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass auch gemäß diesem Ausführungsbeispiel die Metallisierungen für die elektrischen Anschlüsse 1410, 1411 in dem Substrat 1401 zu Beginn des Verfahrens schon vorgesehen sind.
- [0238] Fig. 15 zeigt eine Draufsicht eines Biosensor-Arrays 1500, in dem zylinderförmige Elektroden 1501, 1502 enthalten sind.
- [0239] Jede erste Elektrode 1501 weist ein positives elektrisches Potential auf.
- [0240] Jede zweite Elektrode 1502 des Biosensor-Arrays 1500 weist ein bezüglich der jeweiligen benachbarten ersten Elektrode 1501 negatives elektrisches Potential auf.
- [0241] Die Elektroden 1501, 1502 sind in Zeilen 1503 und Spalten 1504 angeordnet.
- [0242] In jeder Zeile 1503 und in jeder Spalte 1504 sind jeweils die ersten Elektroden 1501 und die zweiten Elektroden 1502 alternierend angeordnet, d. h. jeweils unmittelbar neben einer ersten Elektrode 1501 ist in einer Zeile 1503 oder einer Spalte 1504 eine zweite Elektrode 1502 angeordnet und neben einer zweiten Elektrode 1502 ist jeweils in einer Zeile 1503 oder einer Spalte 1504 eine erste Elektrode 1501 angeordnet.
- [0243] Auf diese Weise ist sichergestellt, dass zwischen den einzelnen Elektroden ein elektrisches Feld erzeugt werden kann mit in Richtung der Höhe der Zylinderelektroden 1501, 1502 im wesentlichen ungekrümmten Feldlinien.
- [0244] Auf den Elektroden ist jeweils, wie oben dargestellt, eine große Anzahl DNA-Sondenmoleküle immobilisiert.
- [0245] Wird nun eine zu untersuchende Lösung (nicht dargestellt) auf das Biosensor-Array 1500 aufgebracht, so hybridisieren die DNA-Stränge mit den auf den Elektroden immobilisierten, dazu komplementären DNA-Sondenmolekülen.
- [0246] Auf diese Weise kann mittels des oben beschriebenen Redox-Recycling-Vorgangs wiederum die Existenz oder Nicht-Existenz von DNA-Strängen einer vorgegebenen Sequenz in einer zu untersuchenden Lösung mittels des Biosensor-Arrays 1500 erfasst werden.
- [0247] Fig. 16 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel eines Biosensor-Arrays 1600 mit einer Vielzahl quaderförmiger Elektroden 1601, 1602.
- [0248] Die Anordnung der quaderförmigen Elektroden 1601, 1602 ist entsprechend der Anordnung der zylinderförmigen Elektroden 1501, 1502, wie sie in Fig. 15 dargestellt worden ist und oben erläutert wurde.
- [0249] Fig. 17 zeigt eine Elektrodenanordnung eines Biosensorchips 1700 gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung.
- [0250] Auf der Isolatorschicht 903 ist die erste Elektrode 901 aufgebracht und mit dem ersten elektrischen Anschluss 904 elektrisch gekoppelt.
- [0251] Die zweite Elektrode 902 ist ebenfalls auf der Isolatorschicht 903 aufgebracht und mit dem zweiten elektrischen Anschluss 905 elektrisch gekoppelt.
- [0252] Wie in Fig. 17 gezeigt ist, weist die zweite Elektrode gemäß diesem Ausführungsbeispiel gegenüber der vorangegangenen beschriebenen zweiten Elektrode eine unterschiedliche Form auf.
- [0253] Die erste Elektrode ist, wie aus Fig. 17 ersichtlich, eine Planarelektrode und die zweite Elektrode ist T-förmig ausgestaltet.
- [0254] Jede T-förmige zweite Elektrode weist einen ersten Schenkel 1701 auf, der im wesentlichen senkrecht zu der Oberfläche 1707 der Isolatorschicht 903 angeordnet.
- [0255] Weiterhin weist die zweite Elektrode 902 senkrecht zu dem ersten Schenkel 1701 angeordnete zweite Schenkel 1702 auf, die zumindest teilweise über der Oberfläche 1703 der jeweiligen ersten Elektrode 901 angeordnet sind.
- [0256] Wie Fig. 17 zu entnehmen ist, sind mehrere erste Elektroden 901 und mehrere zweite Elektroden 902 parallel geschaltet, so dass sich aufgrund der T-förmigen Struktur der zweiten Elektrode 902 ein Hohlraum 1704 ausbildet, der gebildet wird durch zwei nebeneinander angeordnete zweite Elektroden 902, eine erste Elektrode 901 sowie die Isolatorschicht 903.
- [0257] Die einzelnen ersten und zweiten Elektroden 901, 902 sind mittels der Isolatorschicht 903 voneinander elektrisch isoliert.
- [0258] Zwischen den einzelnen zweiten Schenkeln 1702 der zweiten Elektrode 902 ist für jeden Hohlraum 1704 eine Öffnung 1705 vorgesehen, die ausreichend groß ist, so dass bei Aufbringen eines Elektrolyts 1706 auf den Biosensor 1700 das Elektrolyt und eventuell in der zu untersuchenden Lösung 1706, beispielsweise einem Elektrolyt, enthaltene DNA-Stränge durch die Öffnung 1705 in den Hohlraum 1704 gelangen können.
- [0259] Auf Haltebereichen an den ersten und zweiten Elektroden sind DNA-Sondenmoleküle 1709 immobilisiert, die mit den entsprechenden zu erfassenden DNA-Strängen vorgegebener Sequenz hybridisieren können.
- [0260] Wie Fig. 17 zu entnehmen ist, bilden sich aufgrund der einander gegenüberliegenden, im wesentlichen parallel zueinander ausgerichteten Oberflächen der zweiten Elektrode 1708 bzw. der ersten Elektrode 1703, an denen die Haltebereiche zum Halten der DNA-Sondenmoleküle 1709 vorgesehen sind, bei Anlegen eines elektrischen Feldes zwischen der ersten Elektrode 901 und der zweiten Elektrode 902 im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien aus.
- [0261] Fig. 18 zeigt einen Biosensor 1800 gemäß einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung.
- [0262] Der Biosensor 1800 gemäß dem weiteren Ausführungsbeispiel entspricht im wesentlichen dem oben erläuterten und in Fig. 17 gezeigten Biosensor 1700 mit dem Unterschied, dass an Seitenwänden des ersten Schenkels 1701 der zweiten Elektrode 902 keine Haltebereiche mit immobilisierten DNA-Sondenmolekülen 1709 vorgesehen sind, sondern dass die Oberfläche 1801 der ersten Schenkel 1701 der zweiten Elektrode 902 mit Isolatormaterial der Isolatorschicht 903 oder einer weiteren isolierenden Schicht bedeckt sind.

DE 100 15 816 A 1

[0263] Gemäß dem in Fig. 18 gezeigten Ausführungsbeispiel sind Haltebereiche auf der ersten und auf der zweiten Elektrode 901, 902 demnach lediglich an unmittelbar sich gegenüberliegenden Oberflächen der Elektroden, d. h. an der Oberfläche 1802 des zweiten Schenkels der zweiten Elektrode 902, und an der Oberfläche 1803 der ersten Elektrode 901.

[0264] In den Fig. 19a bis Fig. 19g sind einzelne Verfahrensschritte zum Herstellen der ersten Elektrode 901 und der zweiten Elektrode 902 in den Biosensoren 1700, 1800 dargestellt.

5

[0265] In die Isolatorschicht 903 als Substrat, gemäß dem Ausführungsbeispiel aus Siliziumoxid wird unter Verwendung einer Maskenschicht, beispielsweise aus Photolack, eine Struktur in die Isolatorschicht 903 geätzt, deren Form der zu bildenden ersten Elektrode 901 entspricht.

[0266] Nach Entfernen der Maskenschicht durch Veraschen oder durch ein nasschemisches Verfahren wird ganzflächig eine Schicht aus dem gewünschten Elektrodenmaterial auf der Isolatorschicht 903 aufgebracht derart, dass die zuvor geätzte Struktur 1901 (vgl. Fig. 19a) zumindest vollständig gefüllt ist, wobei die Struktur 1901 auch überfüllt sein kann (vgl. Fig. 19b).

10

[0267] In einem weiteren Schritt wird mittels eines chemisch-mechanischen Polierverfahrens (vgl. Fig. 19c) das außerhalb der vorgefertigten Struktur 1901 sich befindende Elektrodenmaterial 1902, vorzugsweise Gold, entfernt.

15

[0268] Nach Beendigung des chemisch-mechanischen Polierverfahrens ist somit die erste Elektrode 901 bündig in die Isolatorschicht 903 eingebettet.

[0269] Elektrodenmaterial 1902 außerhalb, d. h. zwischen den weiteren zweiten Elektroden 902 bzw. zwischen den ersten Elektroden 901 ist restfrei entfernt.

[0270] Auf die erste Elektrode 901 kann ferner eine Deckschicht 1903 beispielsweise aus Siliziumnitrid aufgebracht werden mittels eines geeigneten Beschichtungsverfahrens wie beispielsweise einem CVD-Verfahren, einem Sputterverfahren oder einem Aufdampfverfahren (vgl. Fig. 19d).

20

[0271] Fig. 19e zeigt mehrere erste Elektroden 1901 aus Gold, die nebeneinander in die Isolatorschicht 903 eingebettet sind und die sich darauf befindende Deckschicht 1903.

[0272] In einem weiteren Schritt (vgl. Fig. 19f) wird auf der Deckschicht 1903 eine zweite Elektrodenschicht 1904 aufgebracht.

25

[0273] Nach erfolgter Maskierung, in der die gewünschte Öffnung zwischen den zweiten Elektroden berücksichtigt ist, die aus der zweiten Elektrodenschicht 1904 gebildet werden soll, werden die gewünschten Öffnungen 1905 gebildet und mittels eines Trockenätzverfahrens in einem Downstream-Plasma wird die zweite Elektrodenschicht 1904 geätzt derart, dass der gewünschte Hohlraum 1704 gemäß der in Fig. 17 oder Fig. 18 dargestellten Biosensoren 1700, 1800 gebildet wird (vgl. Fig. 19g).

30

[0274] Es ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass die Deckschicht 1903 nicht unbedingt erforderlich ist, jedoch vorteilhaft ist, um die ersten Elektroden 901 vor Anätzung bei der Bildung des Hohlraums 1704 zu schützen.

[0275] In einer alternativen Ausführungsform kann die T-förmige Struktur der zweiten Elektrode 902 gebildet, indem nach Bilden der ersten Elektrode 901 gemäß dem oben beschriebenen Verfahren eine weitere Isolatorschicht mittels eines CVD-Verfahrens oder eines anderen geeigneten Beschichtungsverfahrens auf die erste Isolatorschicht oder, bei Existenz der Deckschicht 1903 auf der Deckschicht 1903 gebildet wird. Anschließend werden in der Deckschicht 1903 entsprechende Gräben gebildet, die zur Aufnahme des ersten Schenkels 1701 der T-förmigen Struktur der zweiten Elektrode 902 dienen. Diese Gräben werden mit dem Elektrodenmaterial Gold gefüllt und gemäß dem Damascene-Verfahren wird mittels eines chemischmechanischen Polierens das Elektrodenmaterial entfernt, das sich in dem Graben und oberhalb der zweiten Isolatorschicht gebildet hat, bis auf eine vorgegebene Höhe, die der Höhe der zweiten Schenkel 1702 der T-förmigen zweiten Elektrode 902 entspricht.

40

[0276] Mittels Photolithographie wird die Öffnung 1705 zwischen den zweiten Elektroden 902 gebildet und anschließend wird das Isolatormaterial mittels eines Trockenätzverfahrens in einem Downstream-Plasma aus dem Volumen, das als Hohlraum 1704 ausgebildet werden soll, zumindest teilweise entfernt.

[0277] Weiterhin ist darauf hinzuweisen, dass die oben beschriebenen Ausführungsformen nicht auf eine Elektrode beschränkt ist, deren Haltebereich mittels Gold realisiert ist. Es können alternativ Elektroden aus Siliziummonoxid oder Siliziumdioxid, die mit Materialien in den Haltebereichen beschichtet sind. Diese Materialien – beispielsweise bekannte Alkoxy silinderivate – können Amin-, Hydroxyl-, Epoxy-, Acetoxy-, Isocyanat- oder Succinimidylesterfunktionalitäten aufweisen, die eine kovalente Verbindung mit zu immobilisierenden Sondenmolekülen, in dieser Variante insbesondere Liganden, bilden können.

50

[0278] In diesem Dokument sind folgende Veröffentlichungen zitiert:

[1] R. Hintsche et al., Microbiosensors Using Electrodes Made in Si-Technology, Frontiers in Biosensorics, Fundamental Aspects, edited by F. W. Scheller et al., Dirk Hauser Verlag, Basel, S. 267–283, 1997

55

[2] M. Paeschke et al. Voltammetric Multichannel Measurements Using Silicon Fabricated Microelectrode Arrays, Electroanalysis, Vol. 7, Nr. 1, S. 1–8, 1996

[3] R. Hintsche et al. Microbiosensors using electrodes made in Si-technology, Frontiers in Biosensorics, Fundamental Aspects, edited by F. W. Scheller et al. Birkhauser Verlag, Basel, Schweiz, 1997

[4] P. von Gerwen, Nanoscaled Interdigitated Electrode Arrays for Biochemical Sensors, IEEE, International Conference on Solid-State Sensors and Actuators, Chicago, S. 907–910, 16.–19. Juni 1997

60

Patentansprüche

1. Biosensorchip,

- mit einer ersten Elektrode, die einen Haltebereich zum Halten von Sondenmolekülen aufweist, die makromolekulare Biopolymere binden können,
- mit einer zweiten Elektrode,
- wobei die erste Elektrode und die zweite Elektrode derart ausgestaltet sind, dass an ihnen ein Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgang erfolgen kann, und

65

DE 100 15 816 A 1

- mit einer integrierten elektrischen Differentiator-Schaltung, mit der ein während des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs erzeugter elektrischer Strom erfasst und nach der Zeit differenziert werden kann.
- 2. Biosensorchip nach Anspruch 1,
 - mit einer dritten Elektrode,
 - 5 – wobei die zweite Elektrode und die dritte Elektrode derart ausgestaltet sind, dass der Reduktions-/Oxidationsprozess im Rahmen des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs an der zweiten Elektrode und an der dritten Elektrode erfolgt.
- 3. Biosensorchip nach Anspruch 2,
 - 10 – bei dem die erste Elektrode ein erstes elektrisches Potential aufweist,
 - bei dem die zweite Elektrode ein zweites elektrisches Potential aufweist,
 - bei dem die dritte Elektrode ein drittes elektrisches Potential aufweist,
 - wobei das dritte elektrische Potential derart gewählt wird, dass während des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs die Reduktion oder Oxidation nur an der zweiten Elektrode und an der dritten Elektrode erfolgt.
- 4. Biosensorchip nach Anspruch 3,
 - 15 – bei dem das dritte elektrische Potential größer ist als das erste elektrische Potential, und
 - bei dem das erste elektrische Potential größer ist als das zweite elektrische Potential.
- 5. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem der Haltebereich der ersten Elektrode mit einem Material beschichtet ist, das Sondenmoleküle immobilisieren kann.
- 6. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem der Haltebereich der ersten Elektrode zum Halten von Liganden ausgestaltet ist, mit denen Peptide oder Proteine gebunden werden können.
- 20 7. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 5, bei dem der Haltebereich der ersten Elektrode zum Halten von DNA-Sondenmolekülen ausgestaltet ist, mit denen DNA-Moleküle gebunden werden können.
- 8. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei dem der Haltebereich zumindest eines der folgenden Materialien aufweist:
 - 25 – Hydroxylreste,
 - Epoxidreste,
 - Aminreste,
 - Acetoxyreste,
 - Isocyanatreste,
 - 30 – Succinimidylesterreste,
 - Thiolreste,
 - Gold,
 - Silber,
 - Platin,
 - 35 – Titan.
- 9. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei dem die Elektroden in einer Interdigitalelektrodenanordnung angeordnet sind, wobei die dritte Elektrode jeweils zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode angeordnet ist.
- 10. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 9, bei dem die erste Elektrode und die zweite Elektrode und/40 oder die dritte Elektrode derart relativ zueinander angeordnet sind, dass sich zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode und/oder der dritten Elektrode im wesentlichen ungekrümmte Feldlinien eines zwischen der ersten Elektrode und der zweiten Elektrode und/oder der dritten Elektrode erzeugten elektrischen Feldes ausbilden können.
- 11. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 10, bei dem die Differentiator-Schaltung mit der zweiten Elektrode elektrisch gekoppelt ist.
- 45 12. Biosensorchip nach Anspruch 11, bei dem die Differentiator-Schaltung über einen Strom-Spannungswandler mit der zweiten Elektrode elektrisch gekoppelt ist.
- 13. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 12, mit einer Referenzschaltung, die den gleichen Aufbau aufweist wie die Differentiator-Schaltung und mit der ein elektrisches Referenzsignal erzeugbar ist.
- 50 14. Biosensorchip nach Anspruch 13, mit einer Auswerteeinheit zur Auswertung der von der von der Differentiator-Schaltung und von der Referenzschaltung erzeugten elektrischen Signale, wobei mit der Auswerteeinheit die Steigung des Verlaufs des während des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs erzeugten elektrischen Stroms als Funktion der Zeit ermittelt werden kann.
- 15. Biosensorchip nach einem der Ansprüche 1 bis 14,
 - 55 – mit einer Vielzahl erster Elektroden, die einen Haltebereich zum Halten von Sondenmolekülen aufweisen, die makromolekulare Biopolymere binden können,
 - mit einer Vielzahl zweiter Elektroden,
 - wobei die ersten und zweiten Elektroden in einem Elektroden-Array angeordnet sind.
- 16. Biosensorchip nach Anspruch 15,
 - 60 – mit einer Vielzahl dritter Elektroden,
 - wobei die zweiten Elektroden und die dritten Elektroden derart ausgestaltet sind, dass der Reduktions-/Oxidationsprozess im Rahmen des Reduktions-/Oxidations-Recycling-Vorgangs an den zweiten Elektroden und an den dritten Elektroden erfolgt.

FIG 1

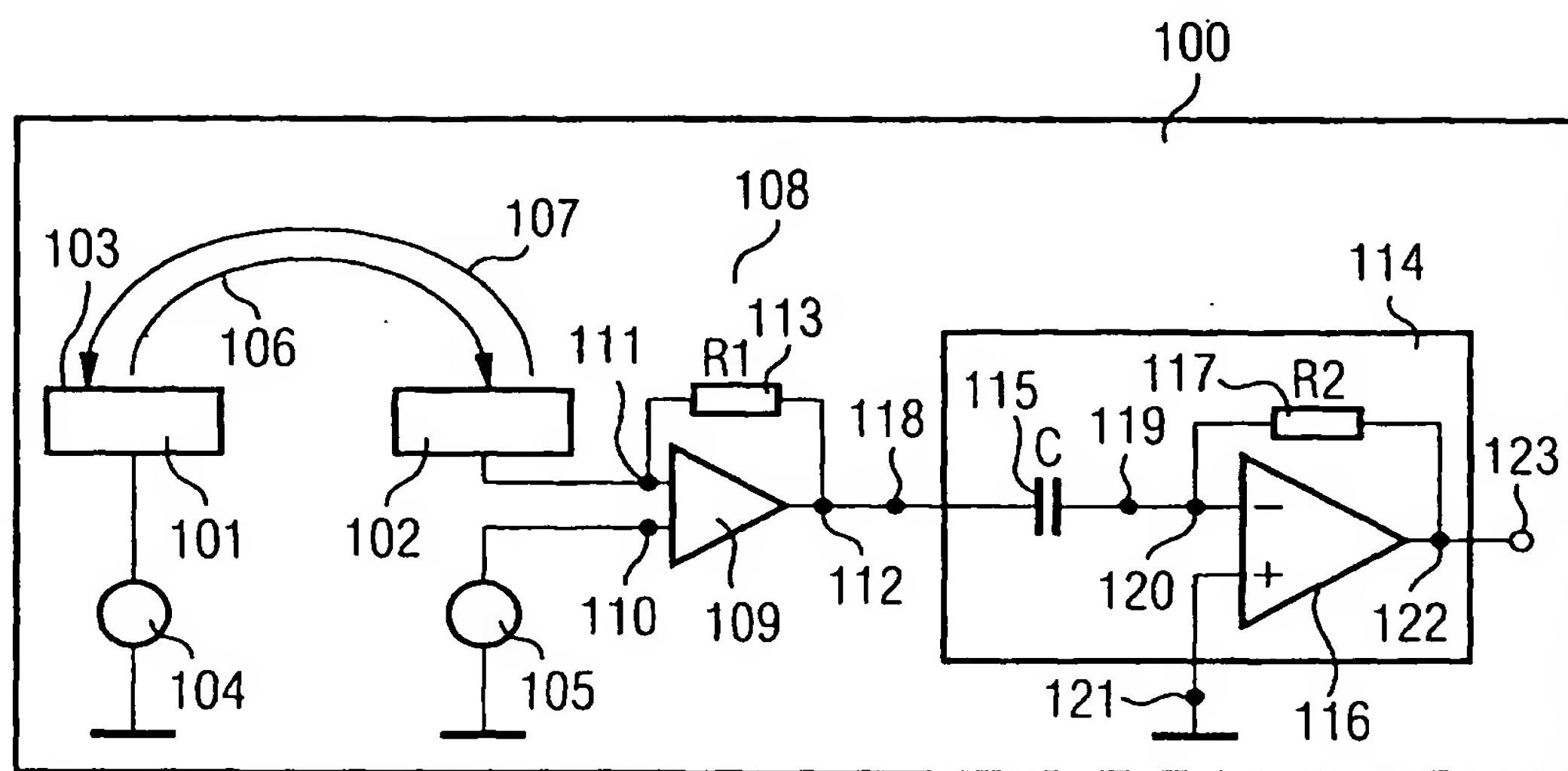


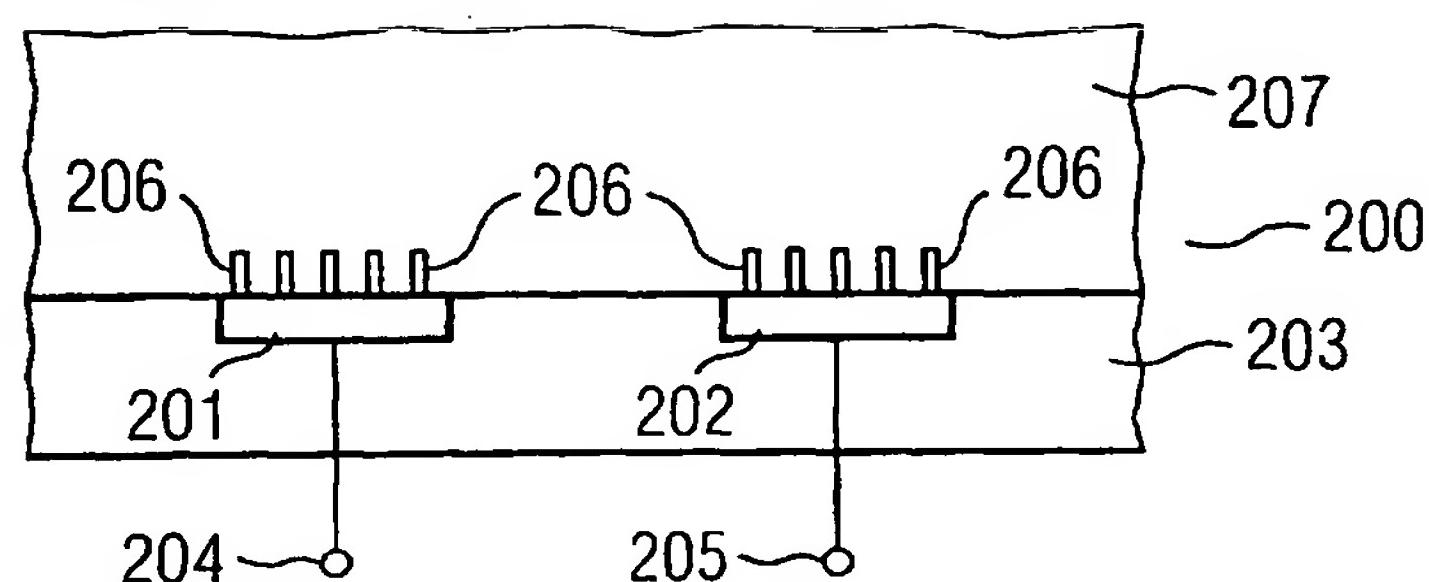
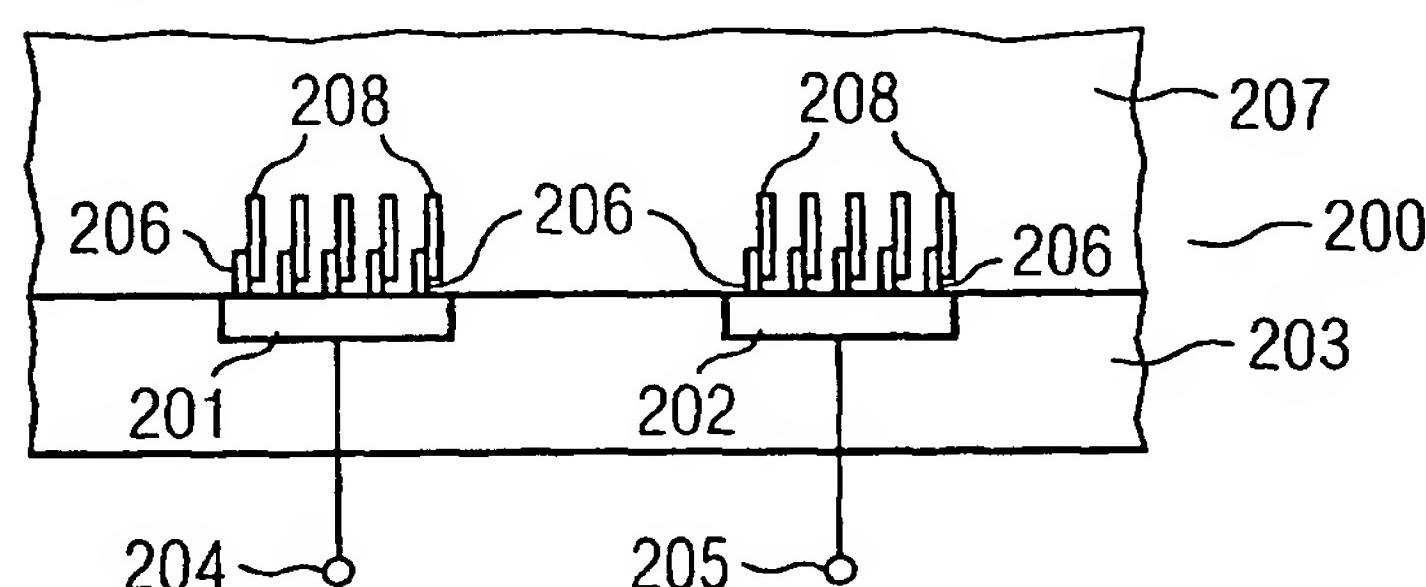
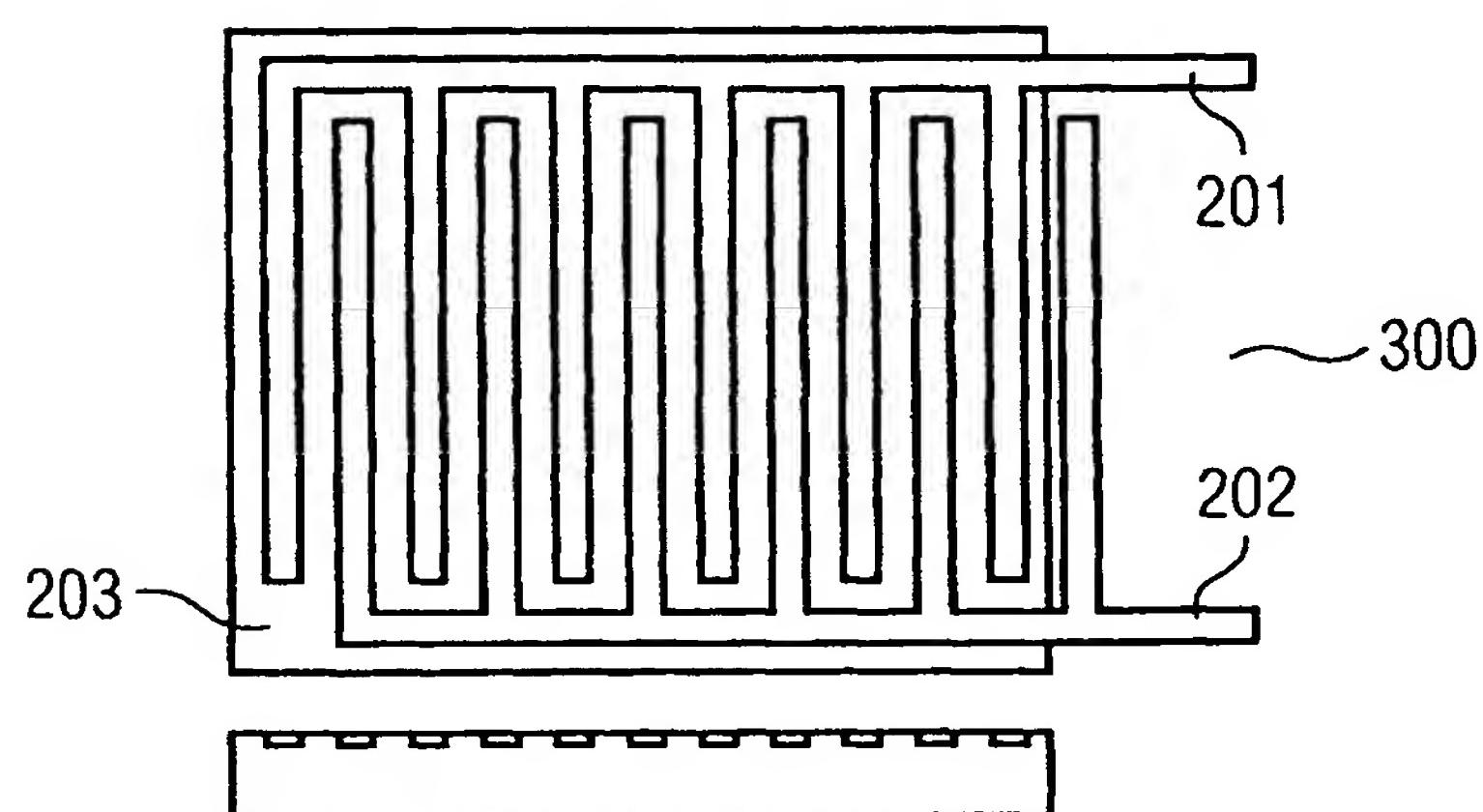
FIG 2A**FIG 2B****FIG 3**

FIG 4A

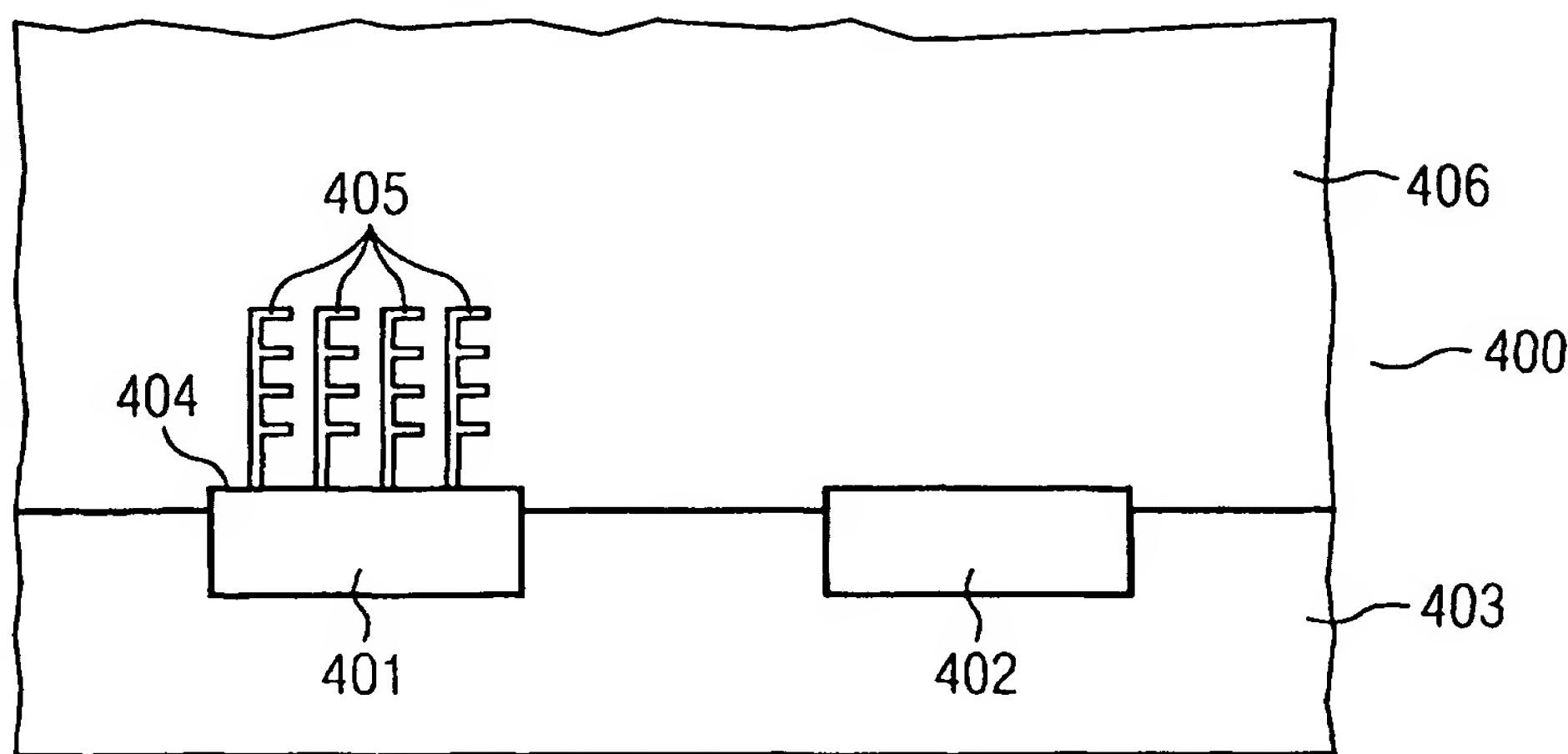


FIG 4B

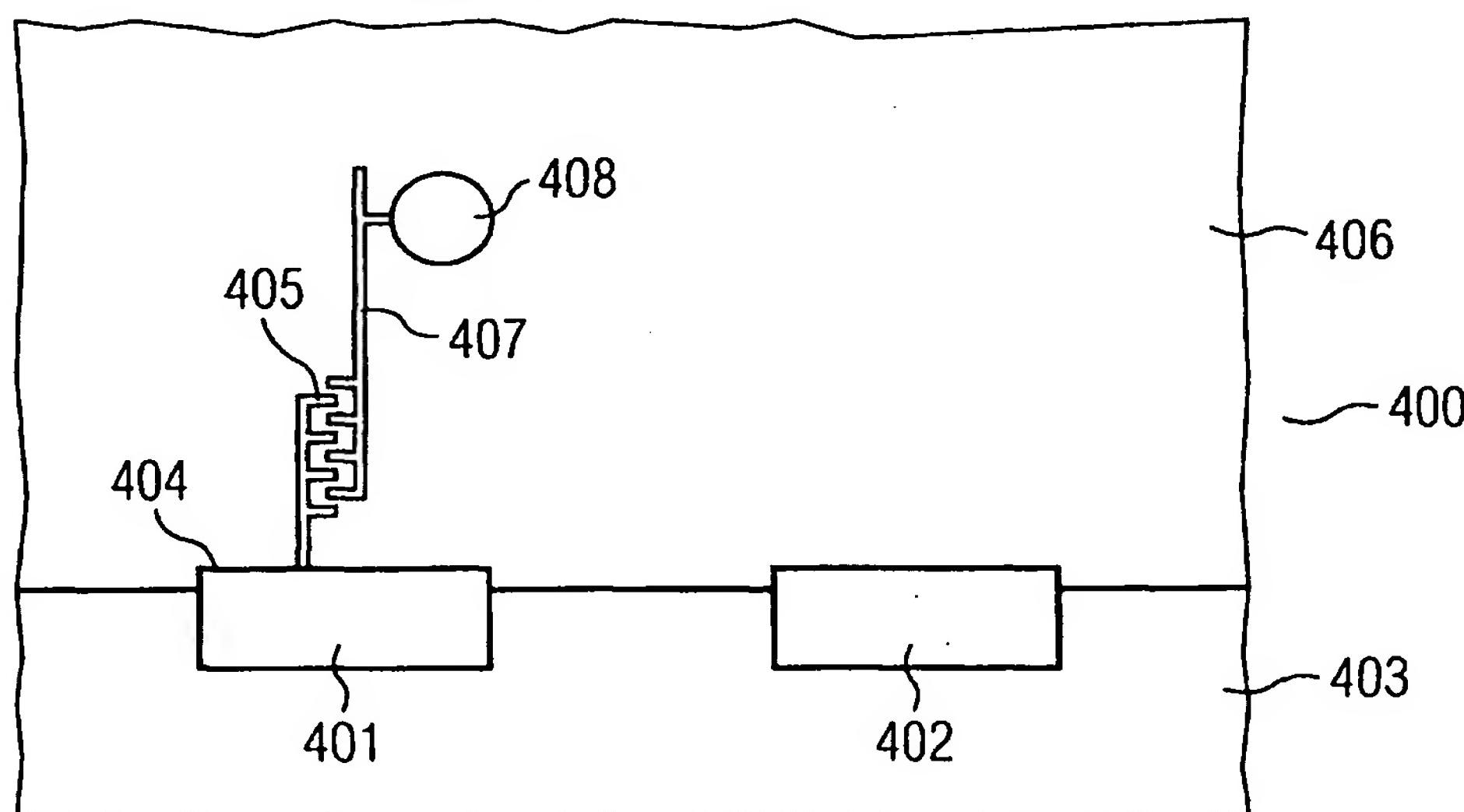


FIG 4C

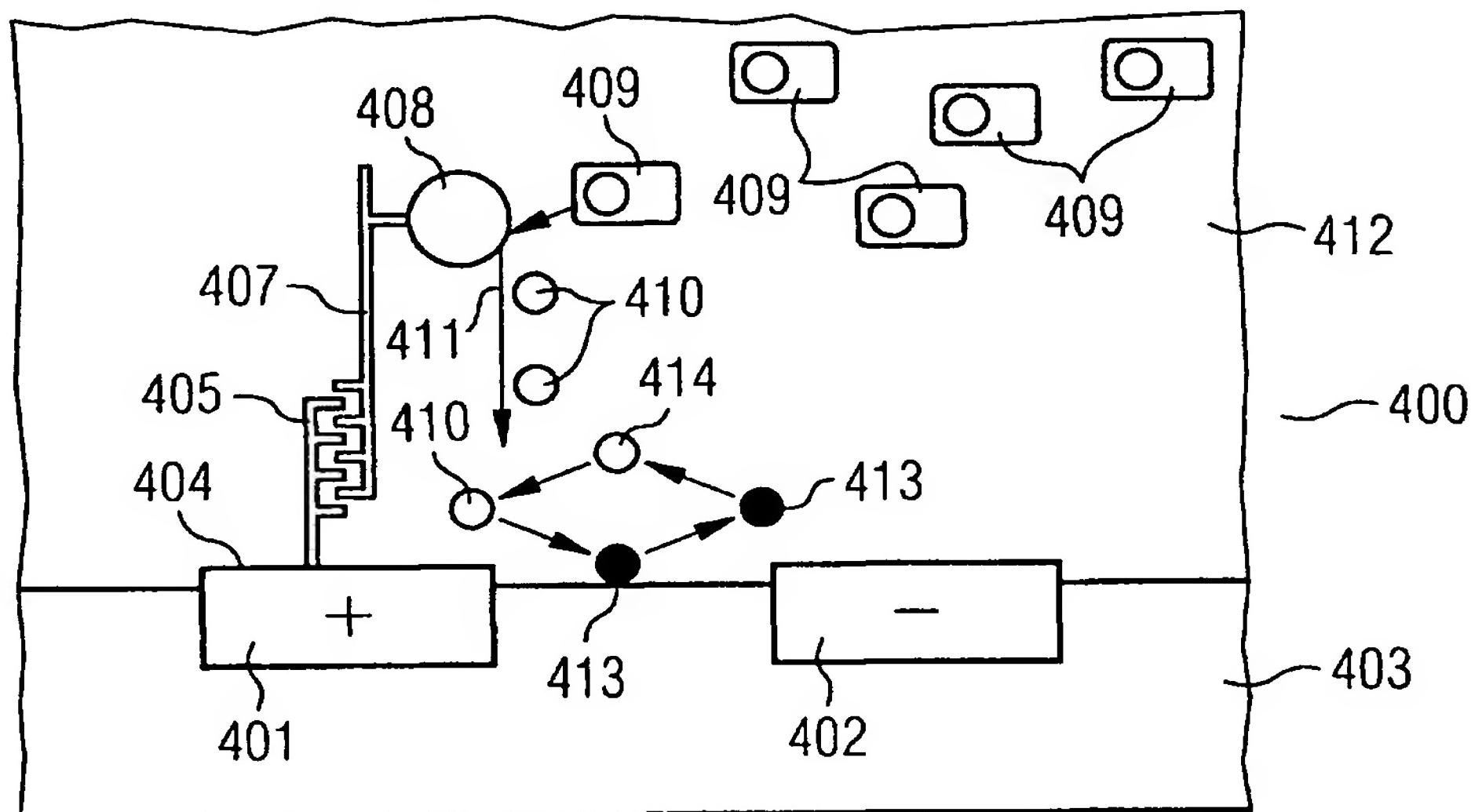


FIG 5

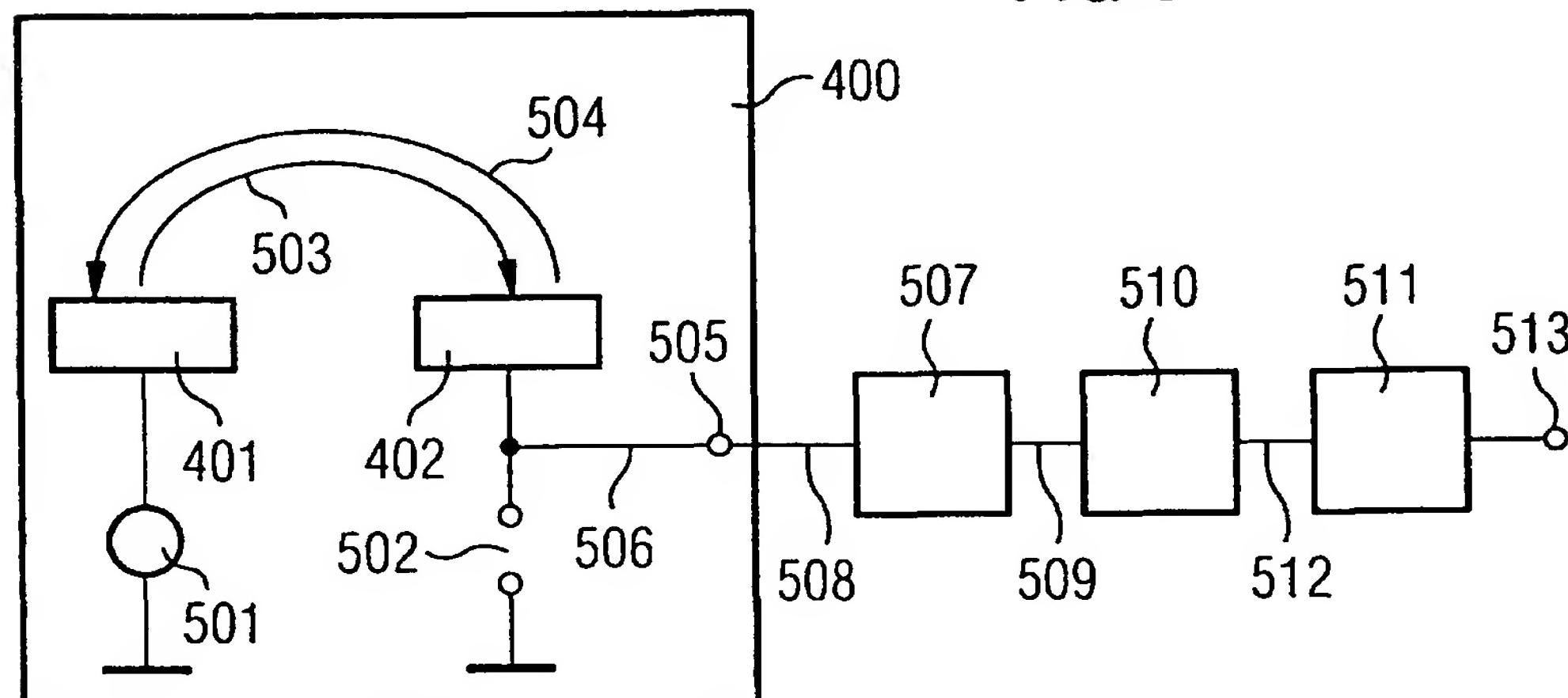


FIG 6A

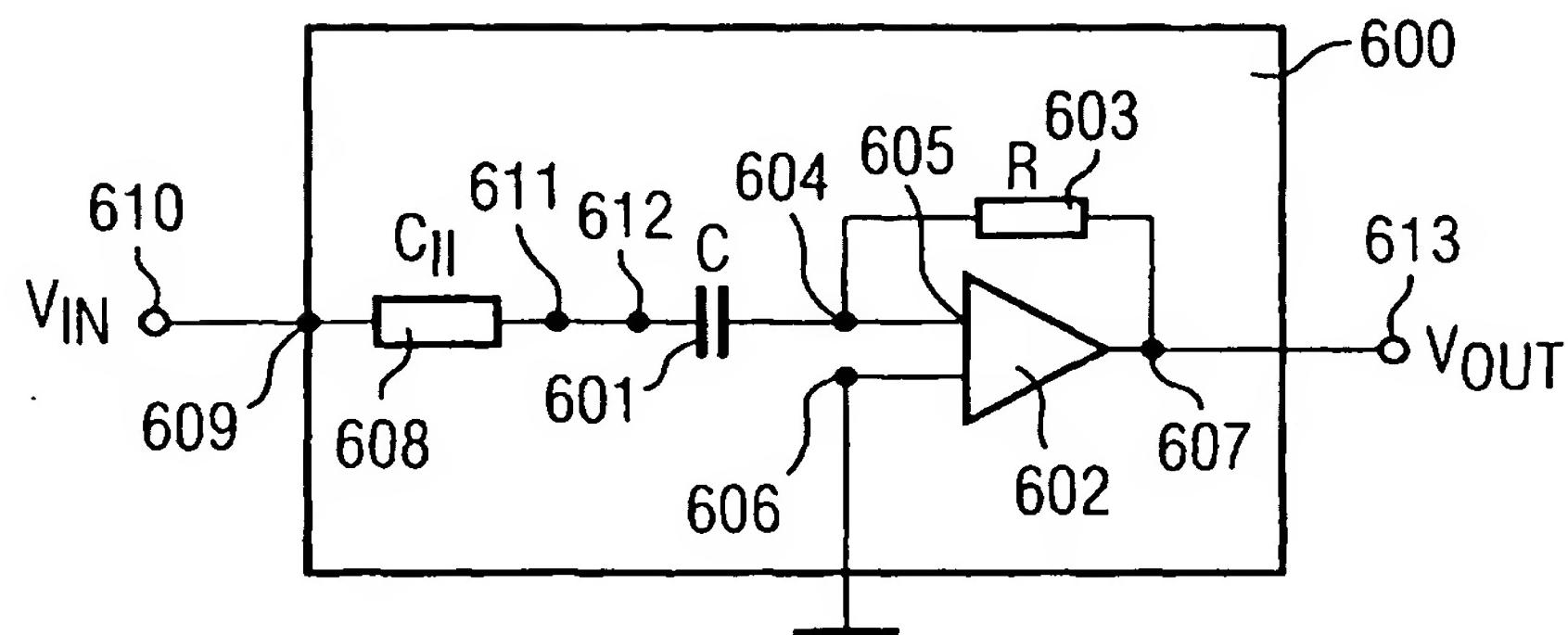
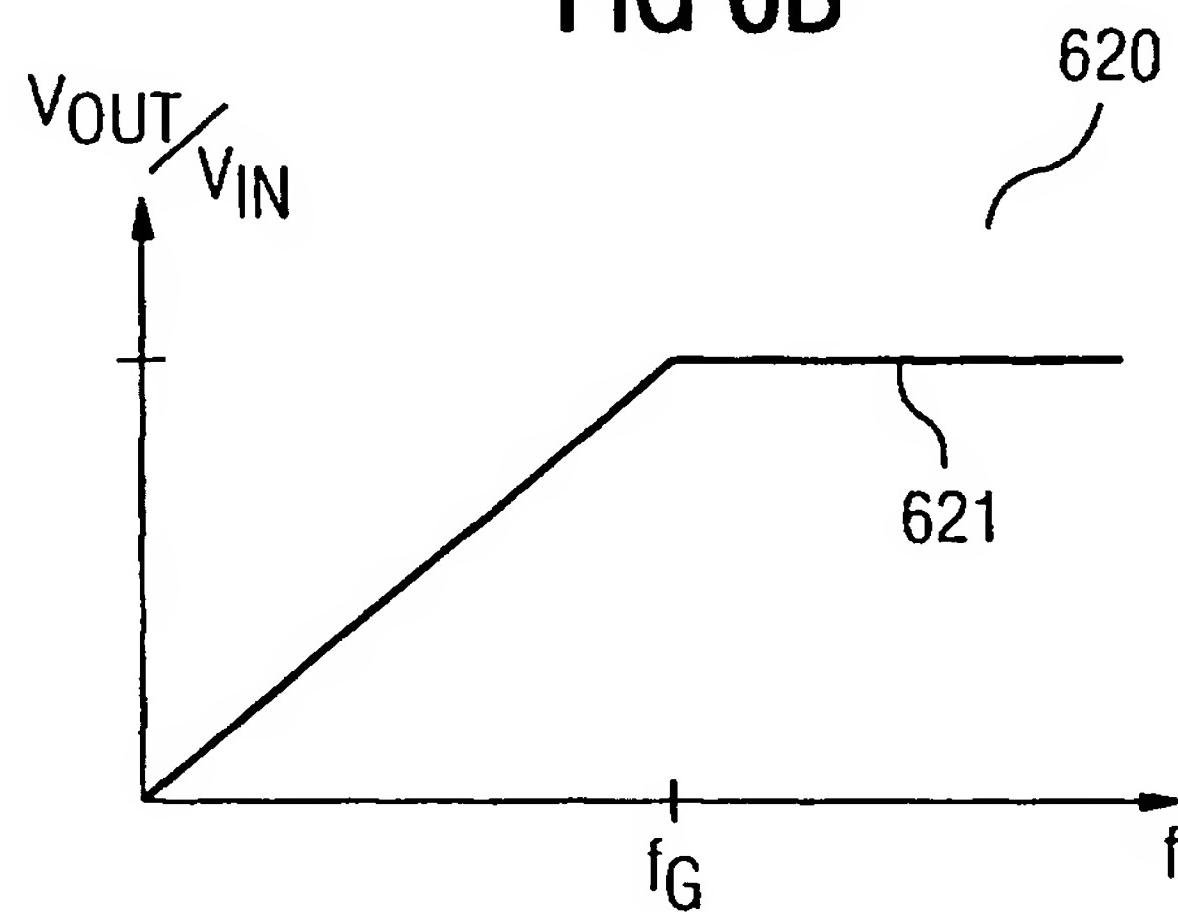


FIG 6B



1
E
G
E

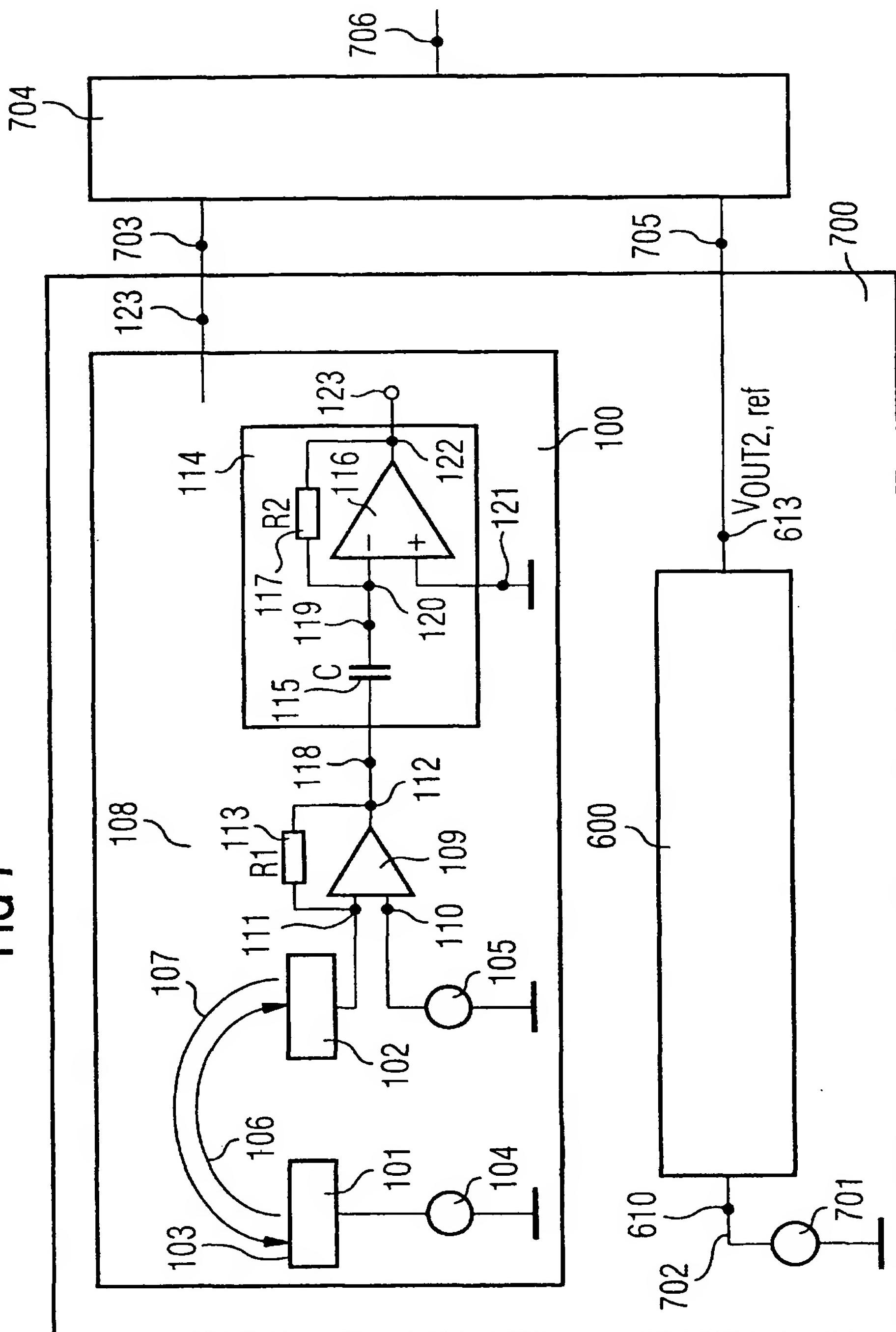


FIG 8

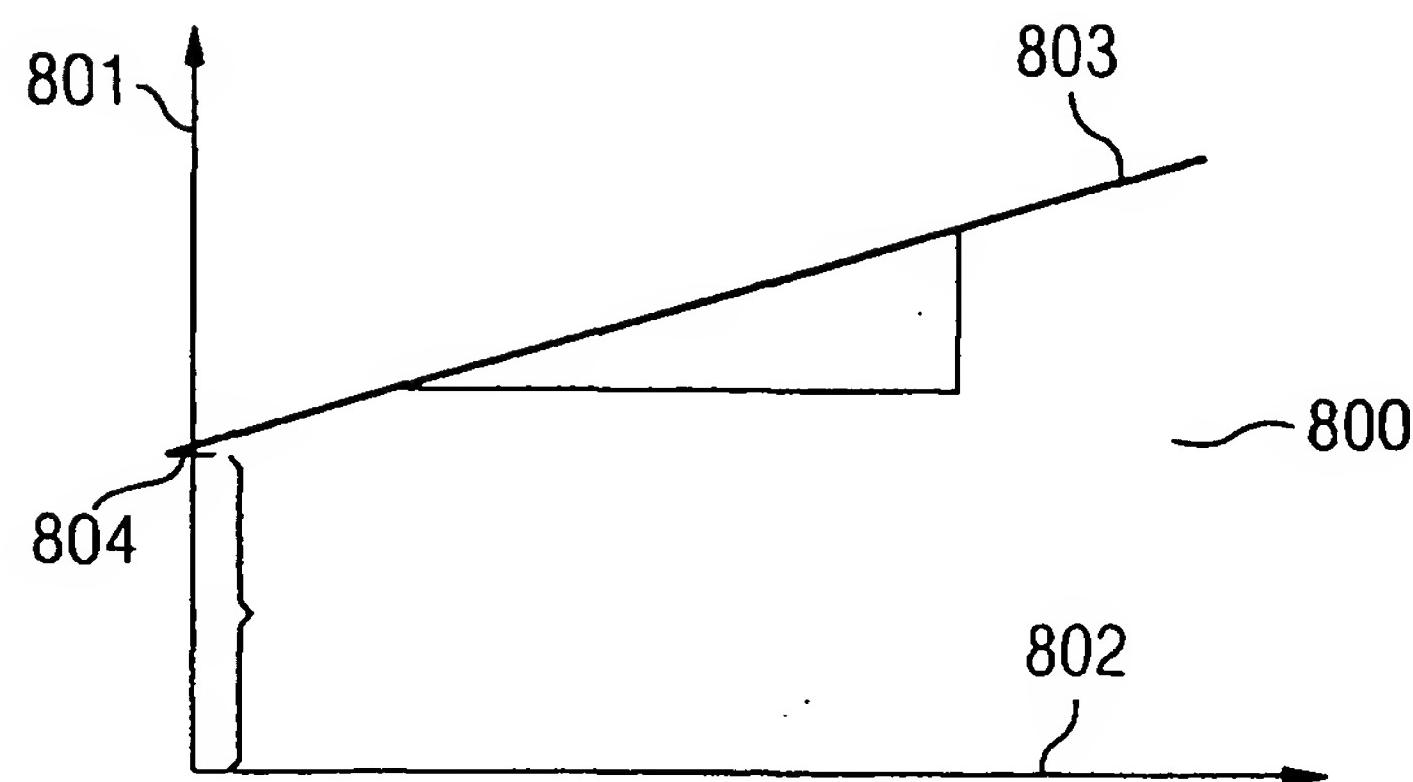


FIG 9

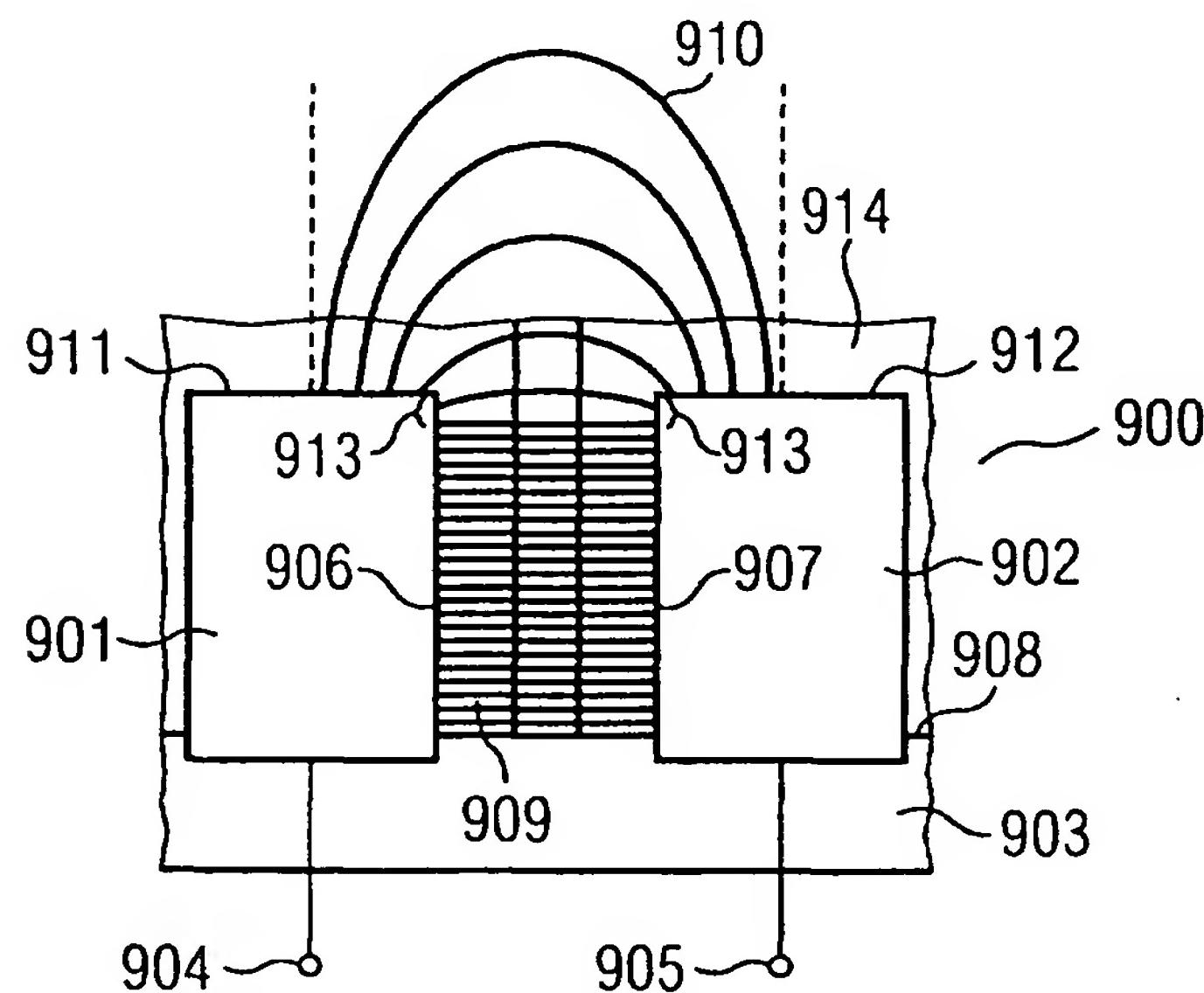


FIG 10

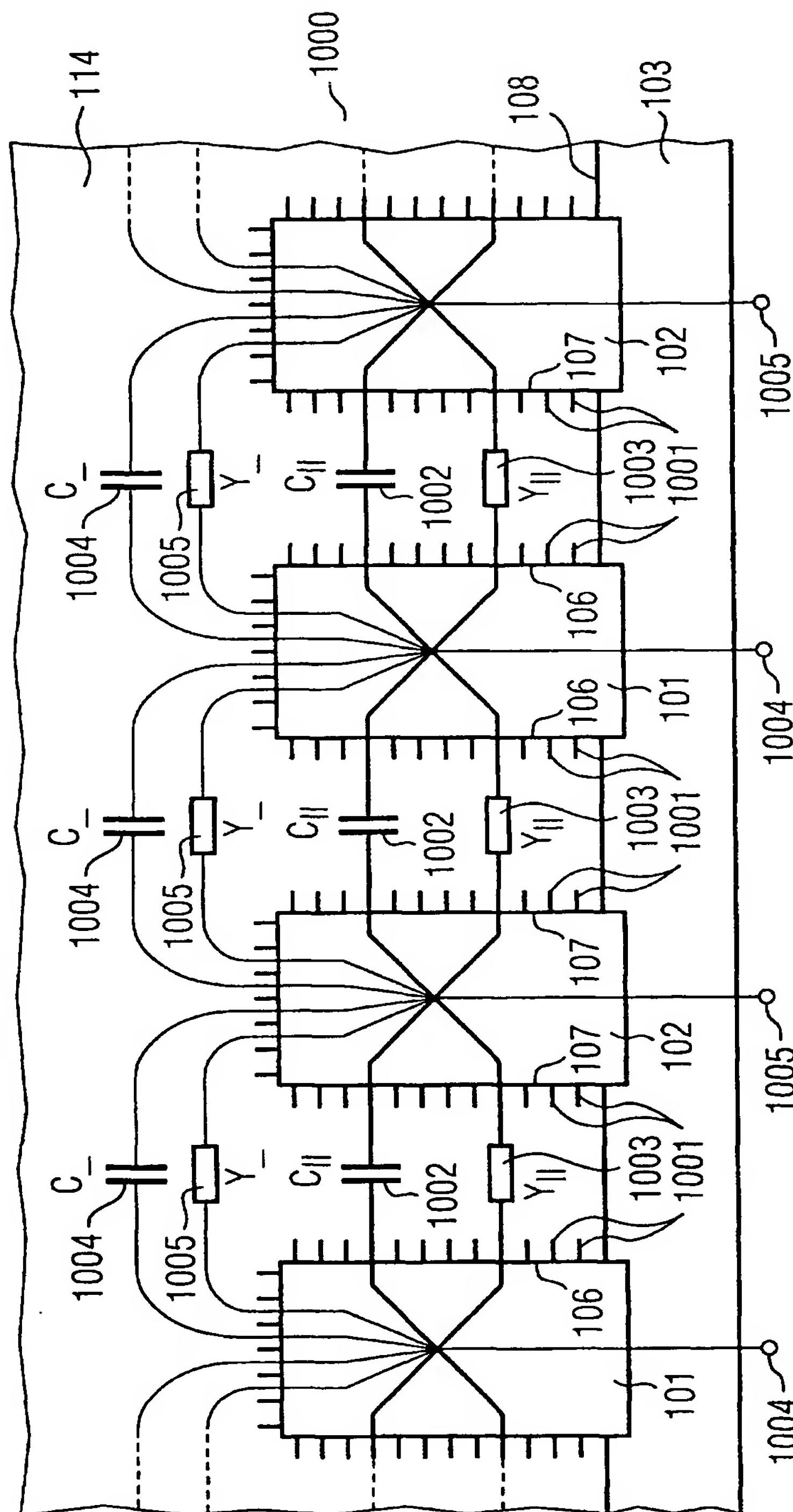


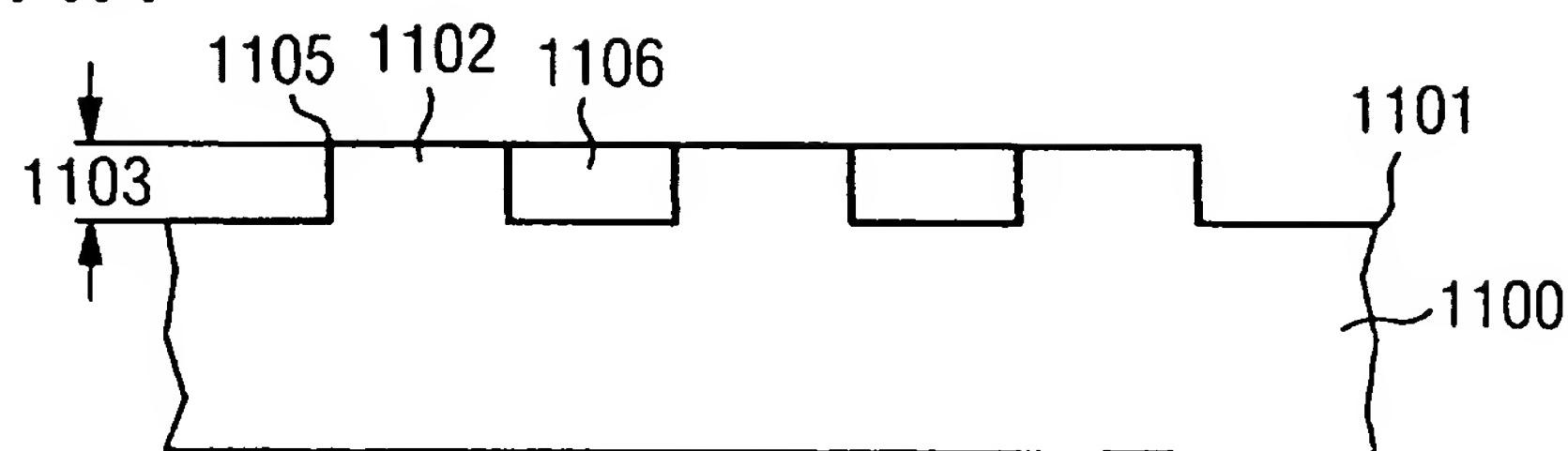
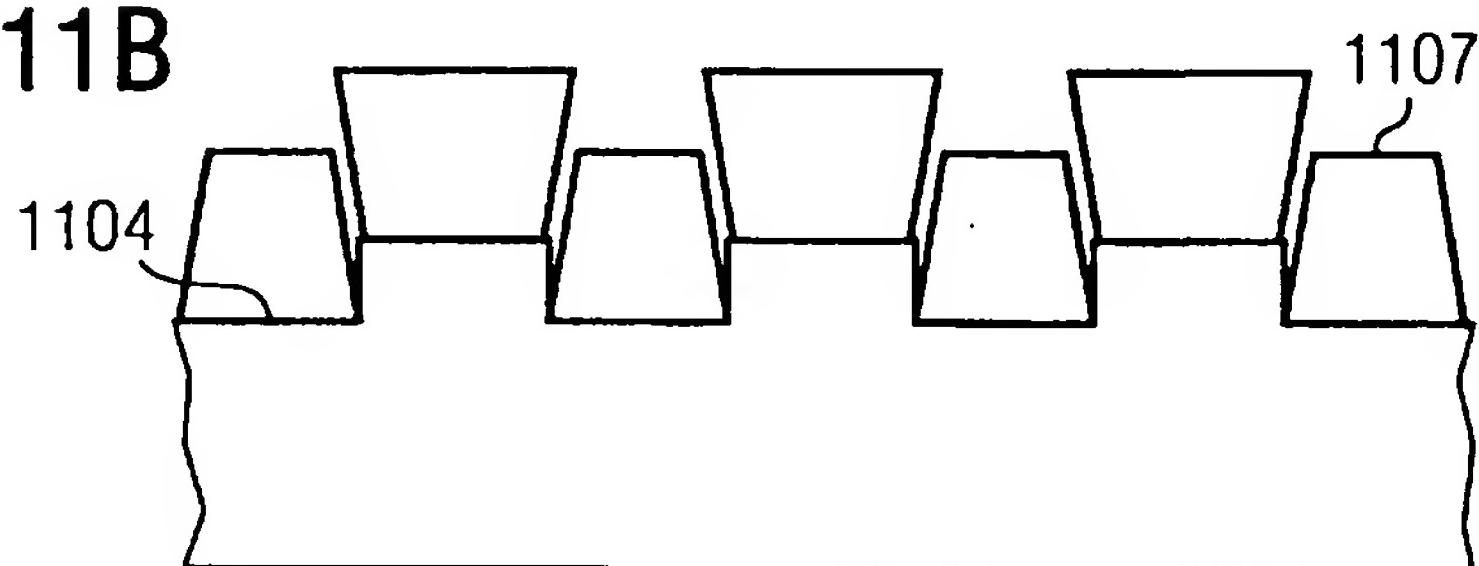
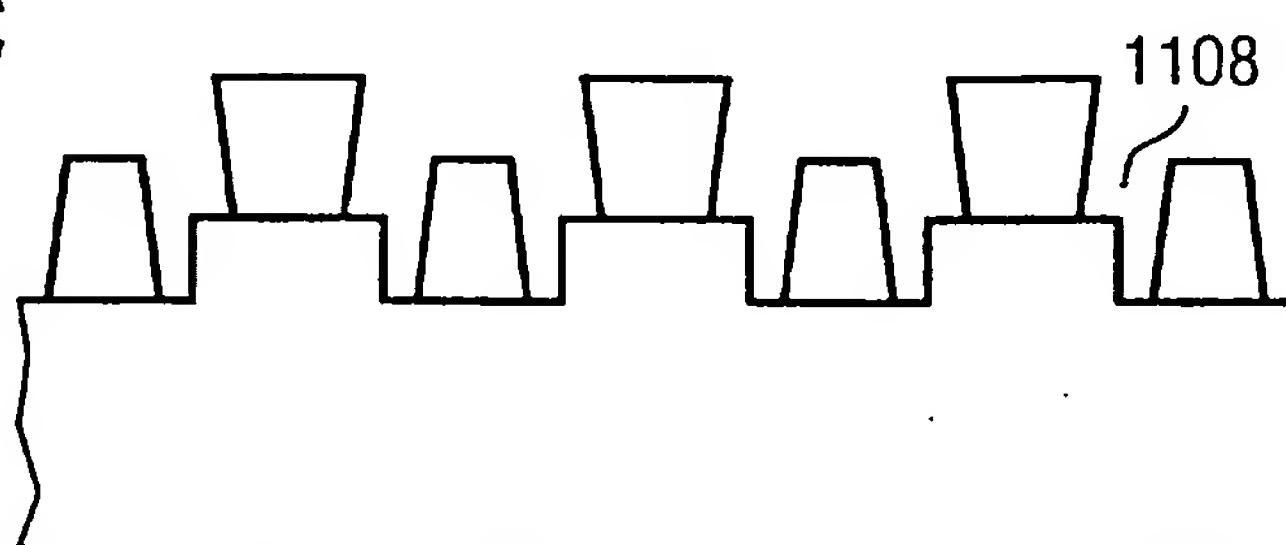
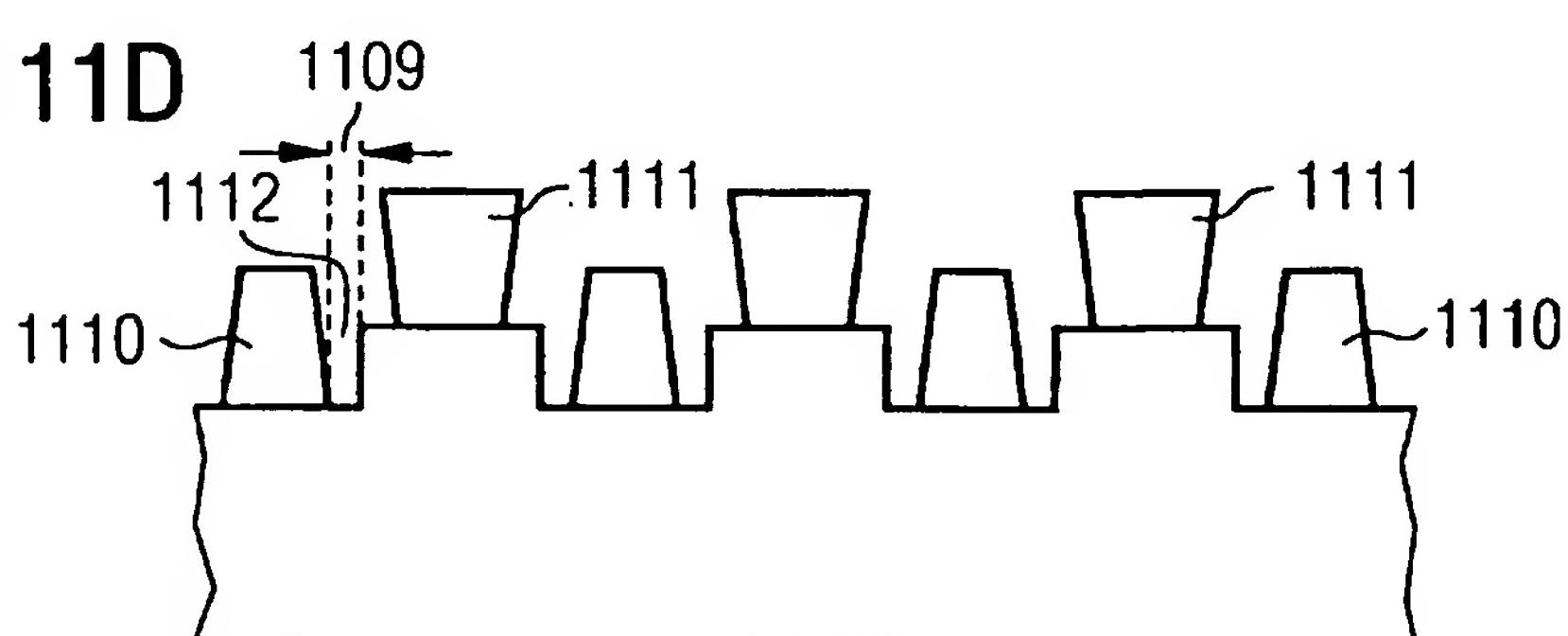
FIG 11A**FIG 11B****FIG 11C****FIG 11D**

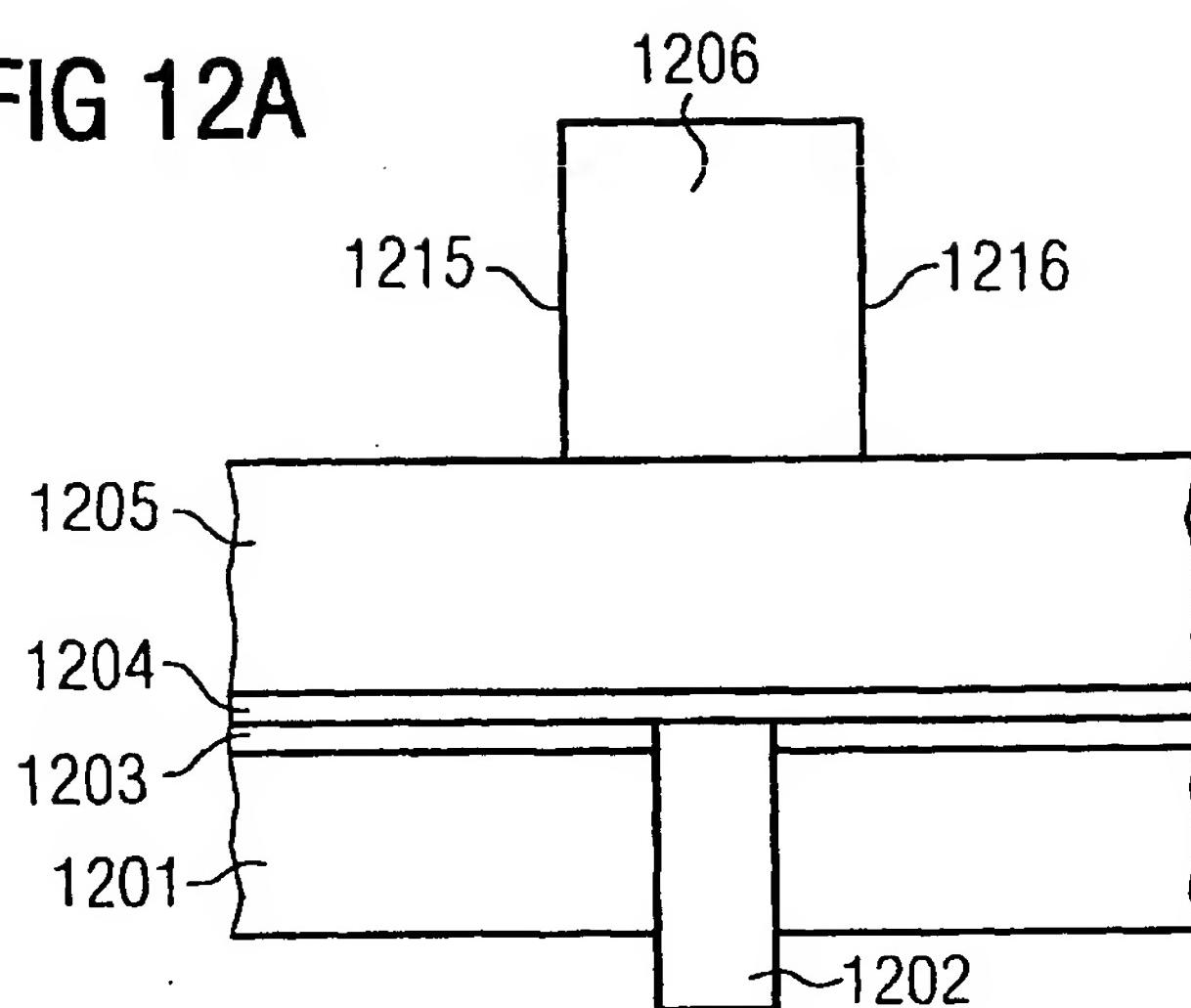
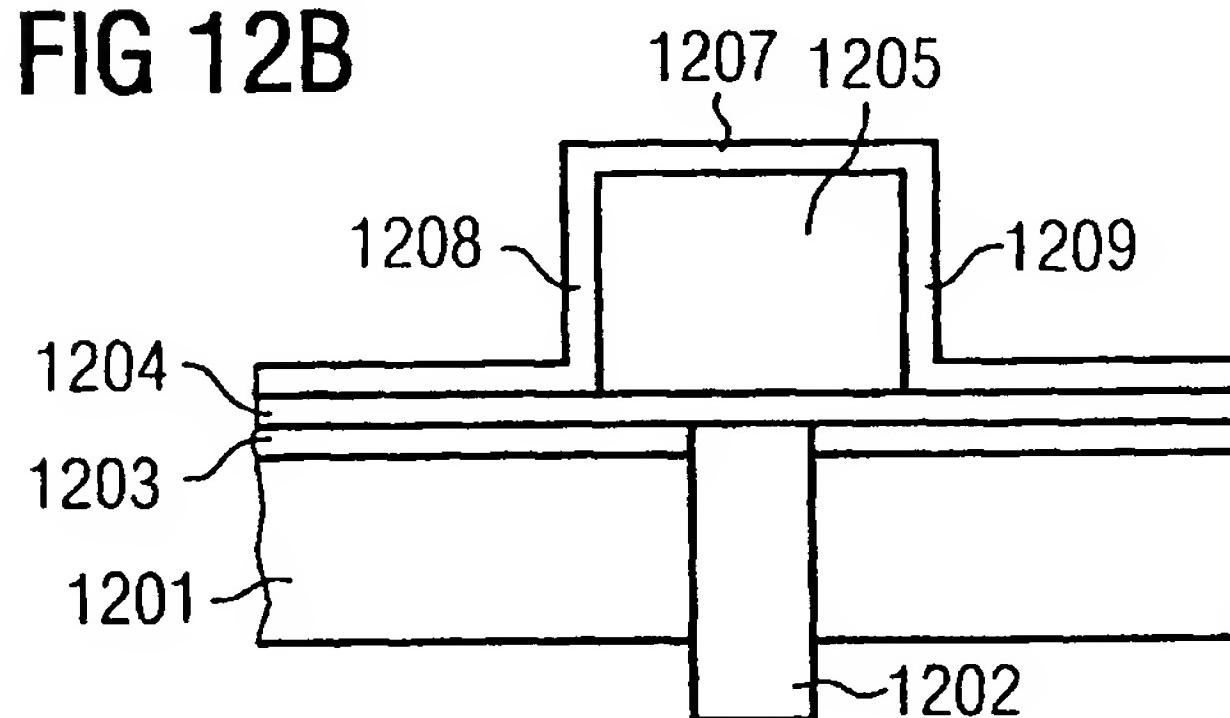
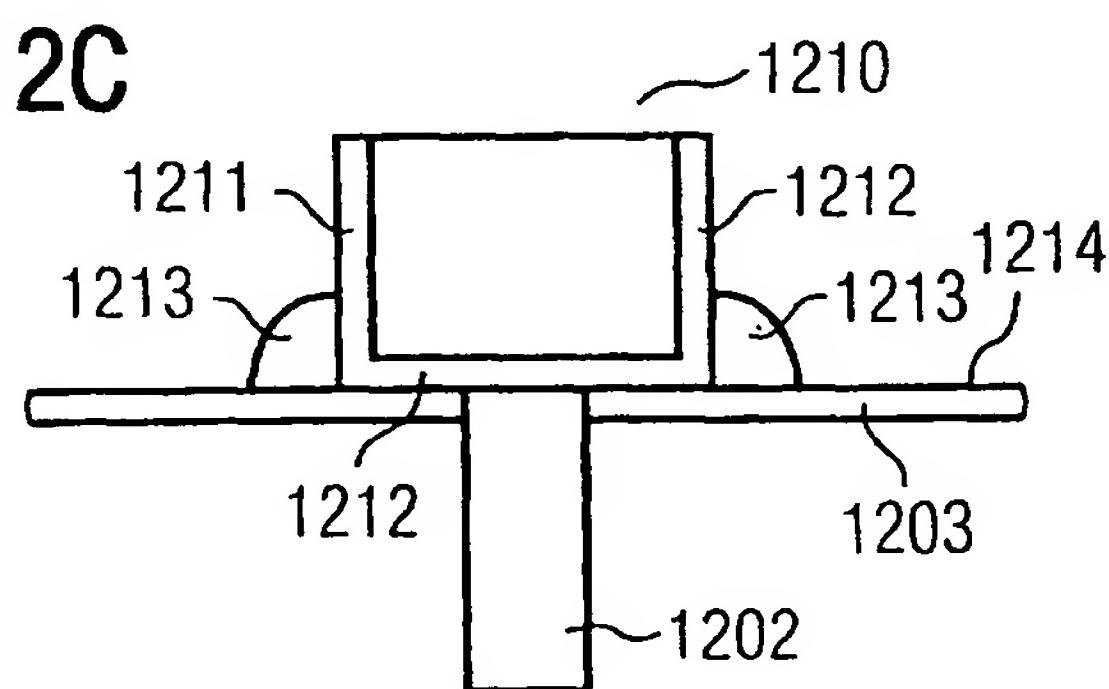
FIG 12A**FIG 12B****FIG 12C**

FIG 13A

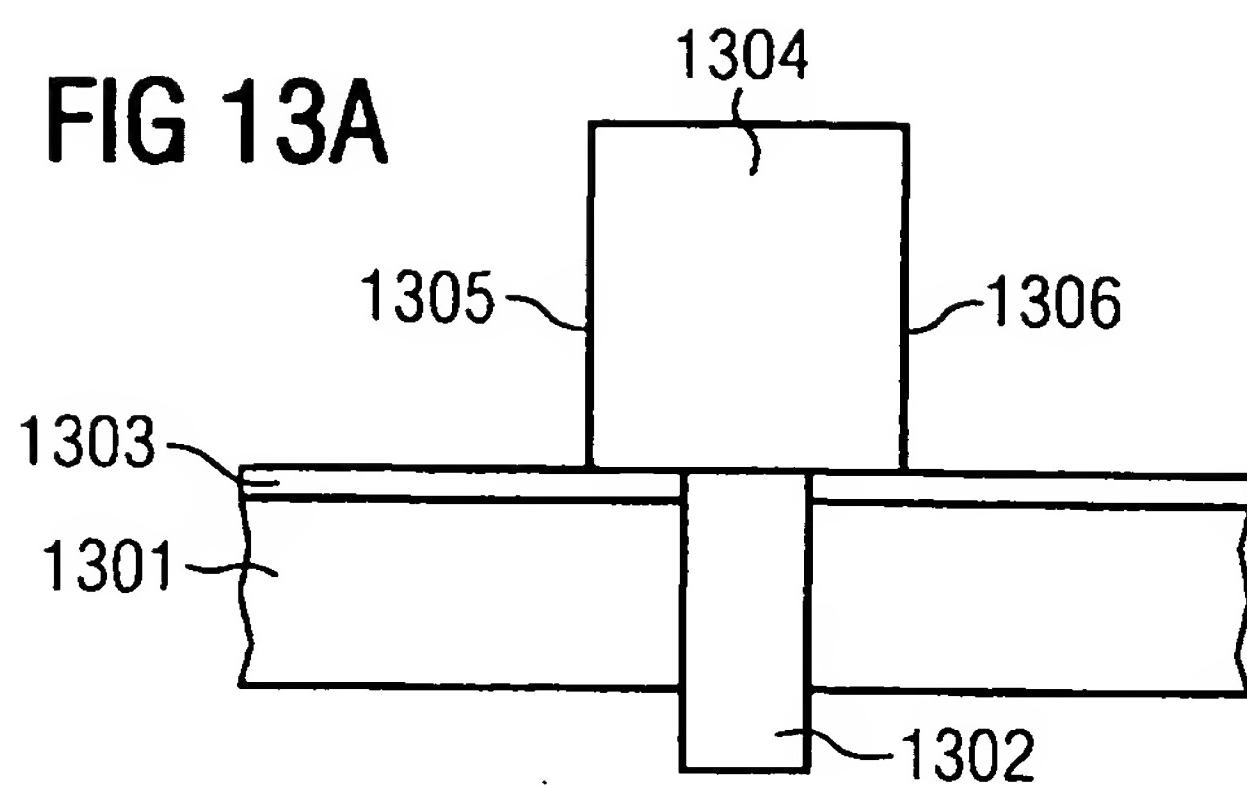


FIG 13B

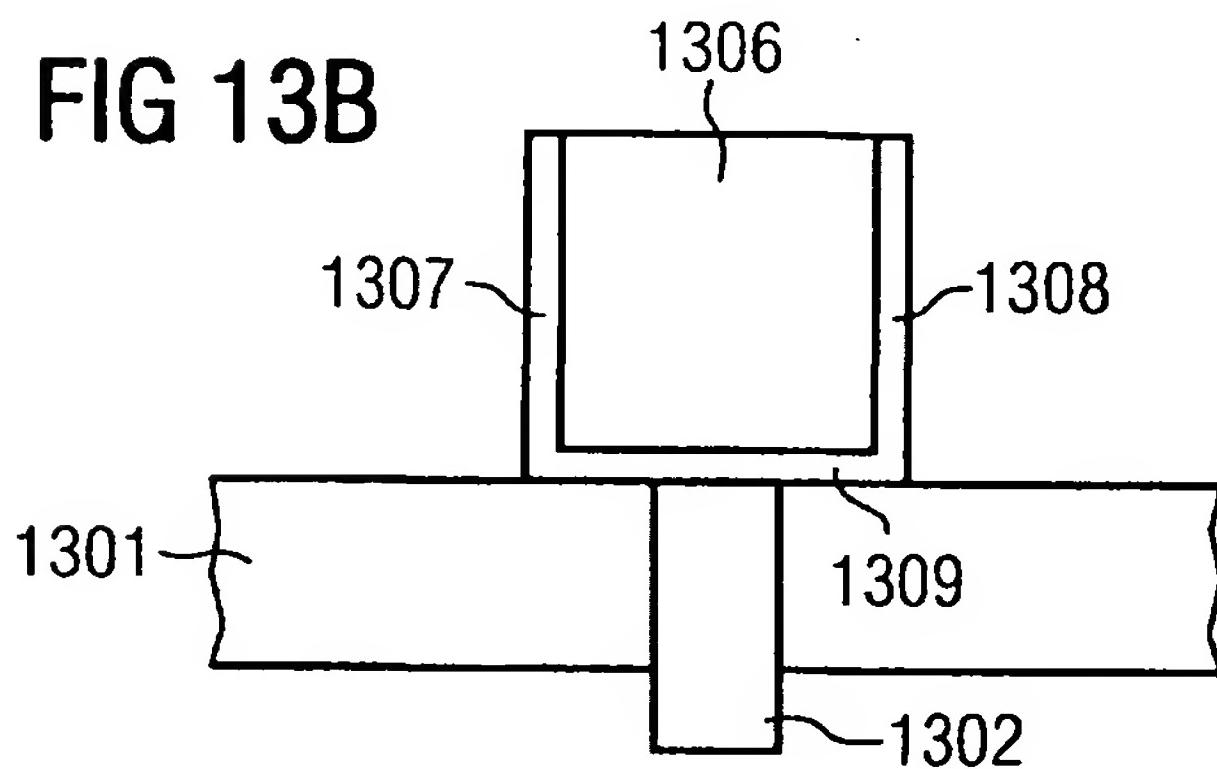


FIG 13C

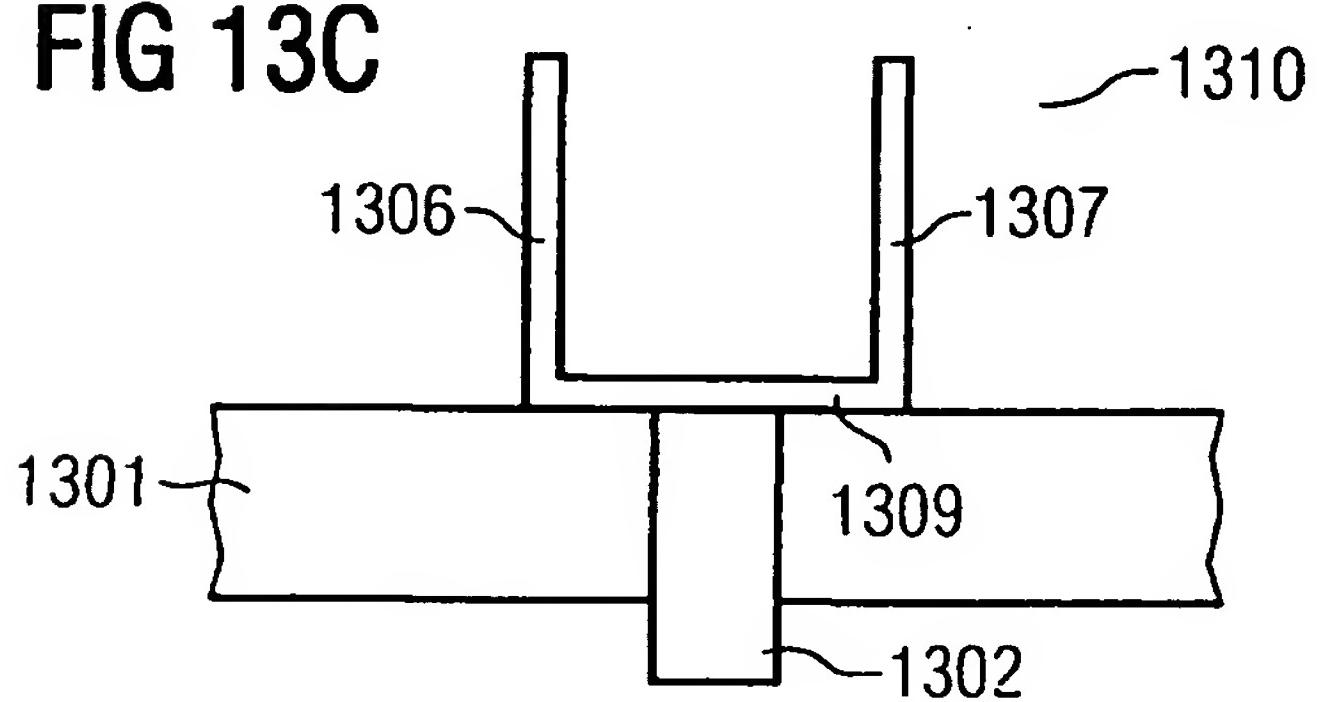


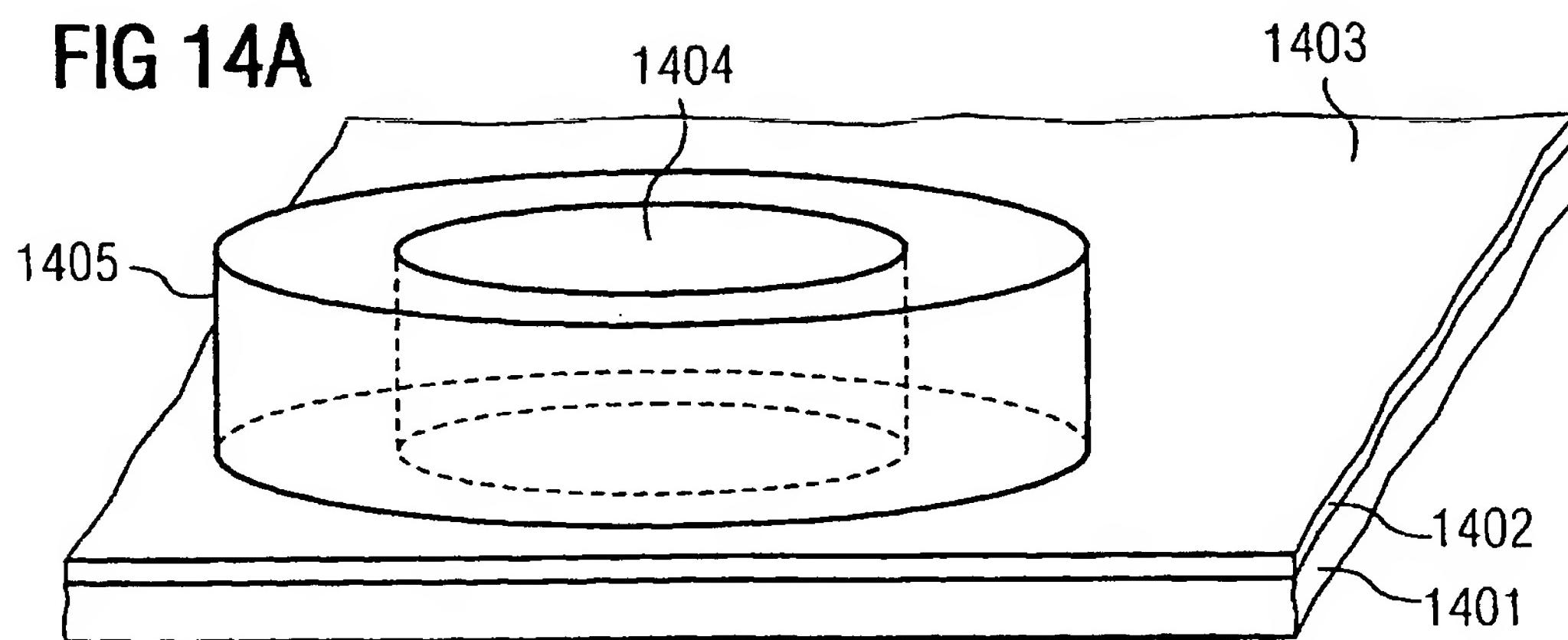
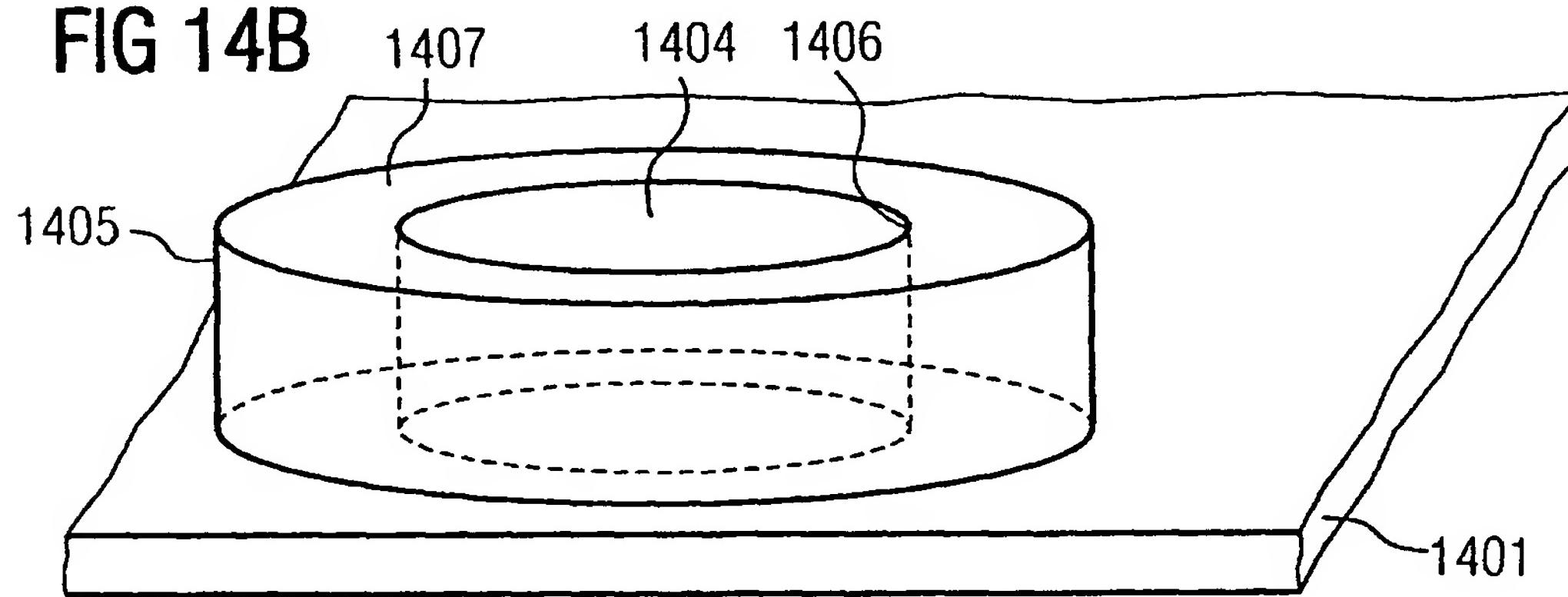
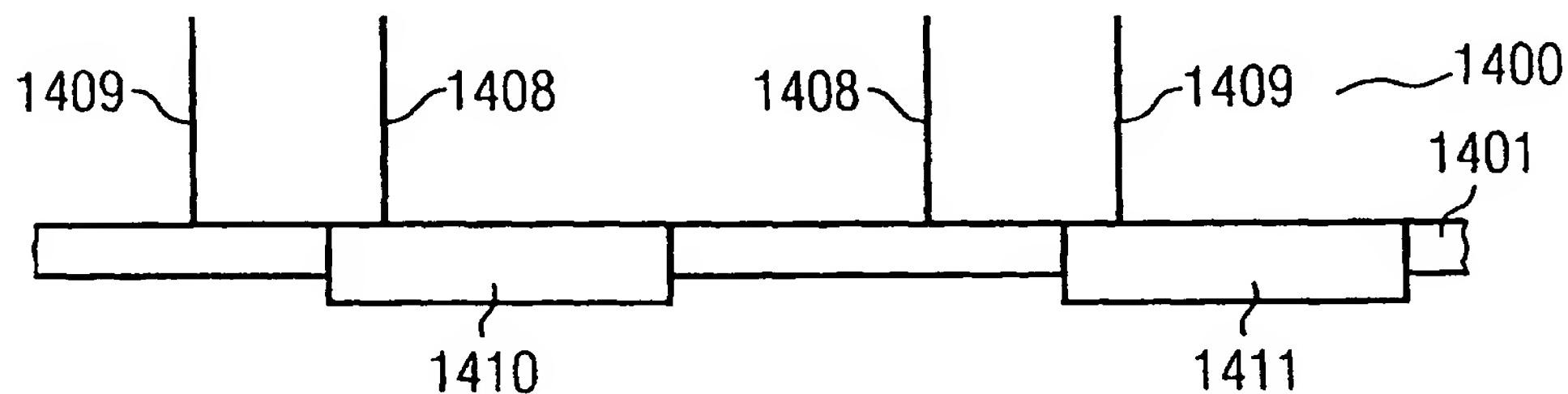
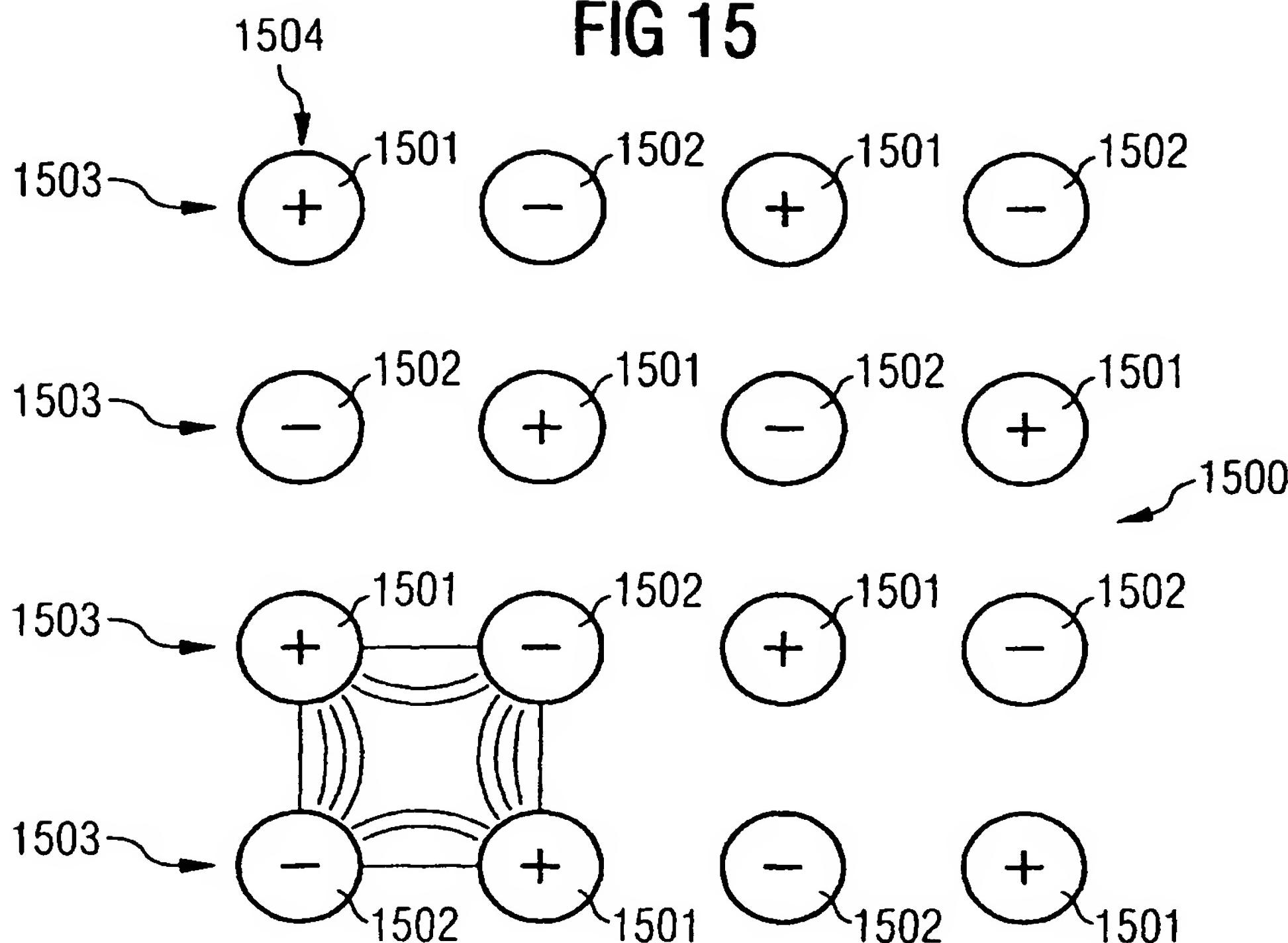
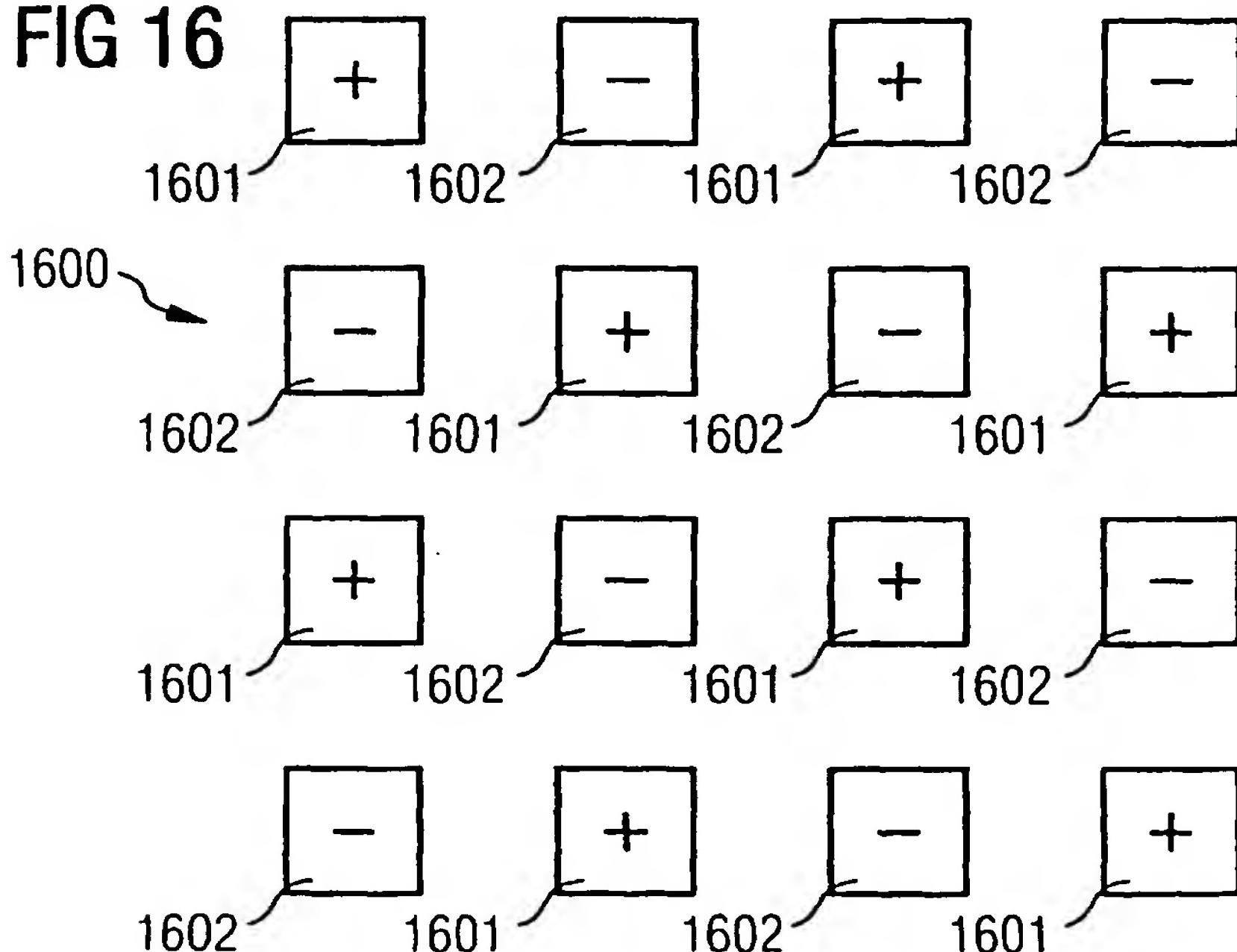
FIG 14A**FIG 14B****FIG 14C**

FIG 15**FIG 16**

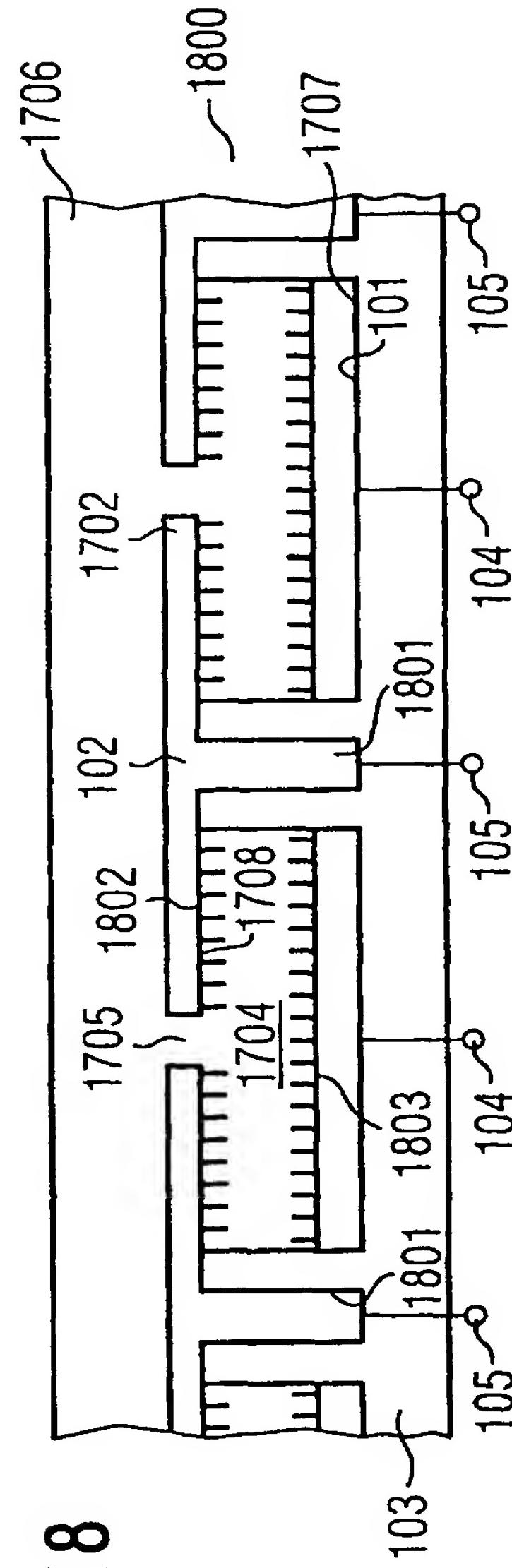
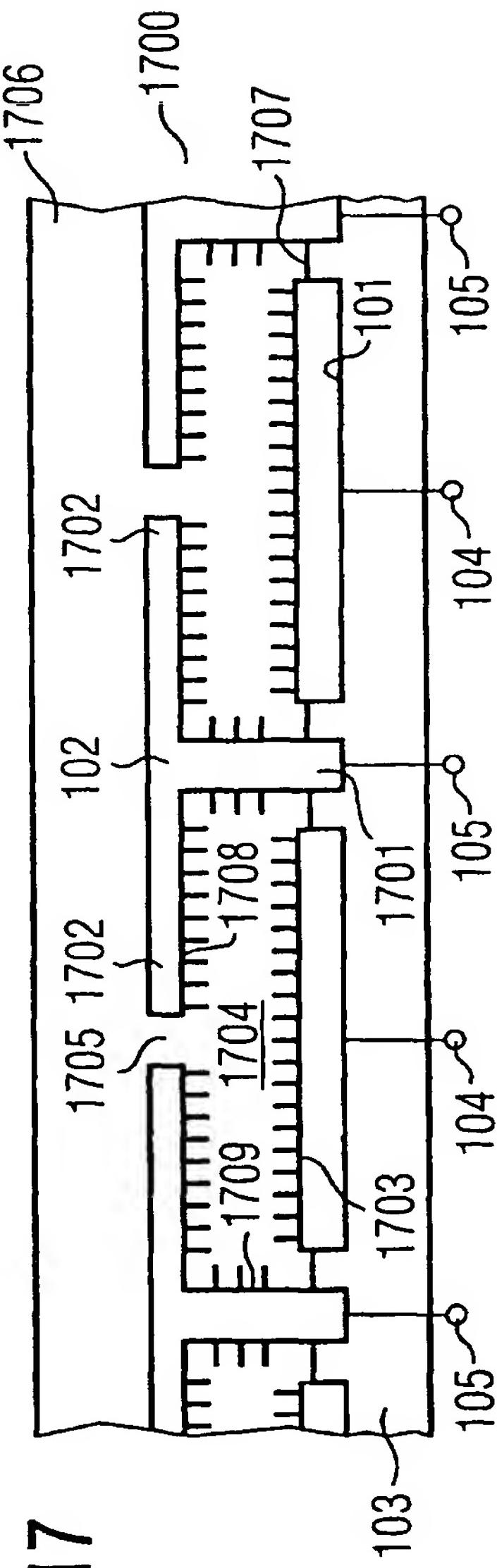


FIG 19A

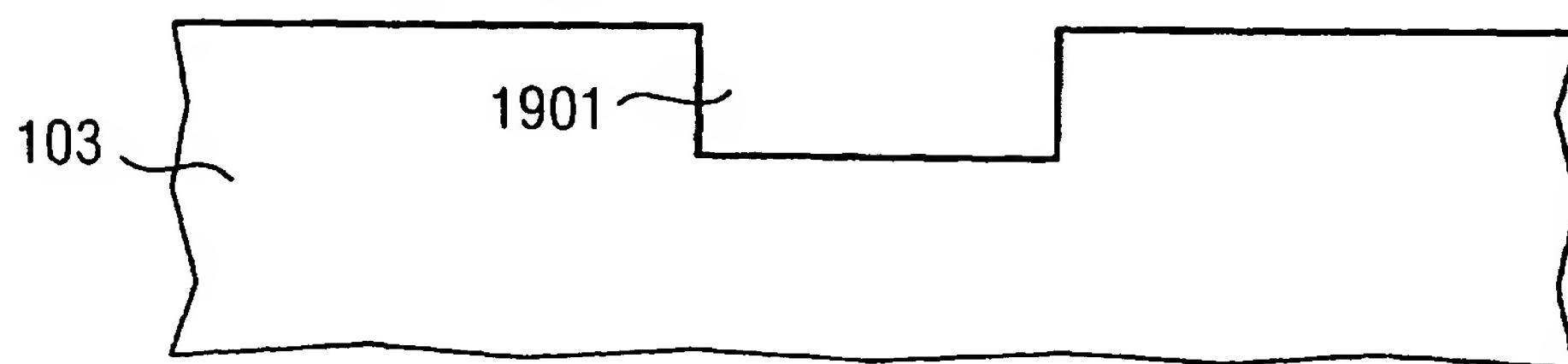


FIG 19B

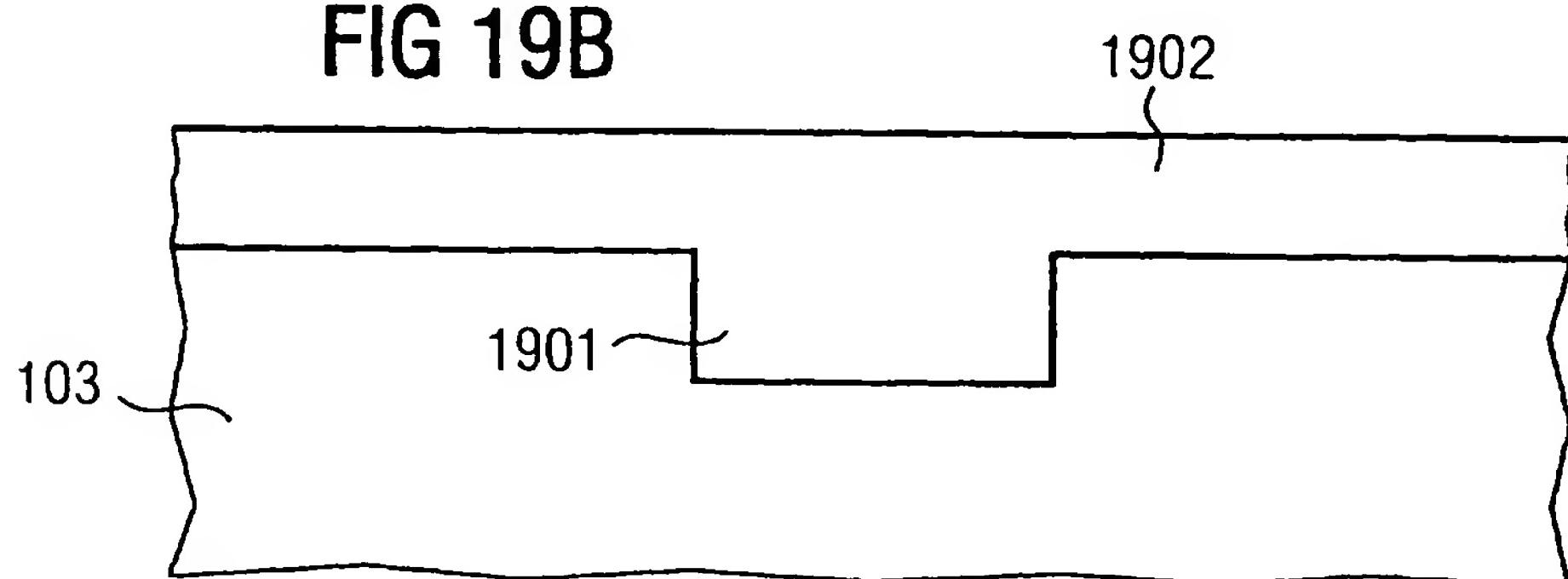


FIG 19C

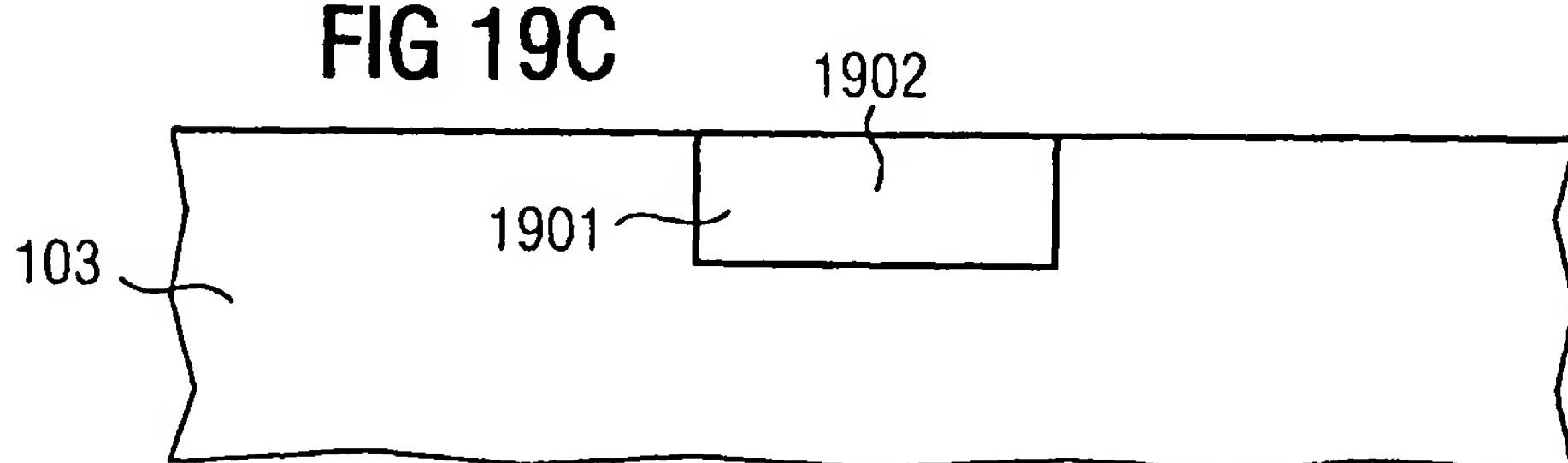


FIG 19D

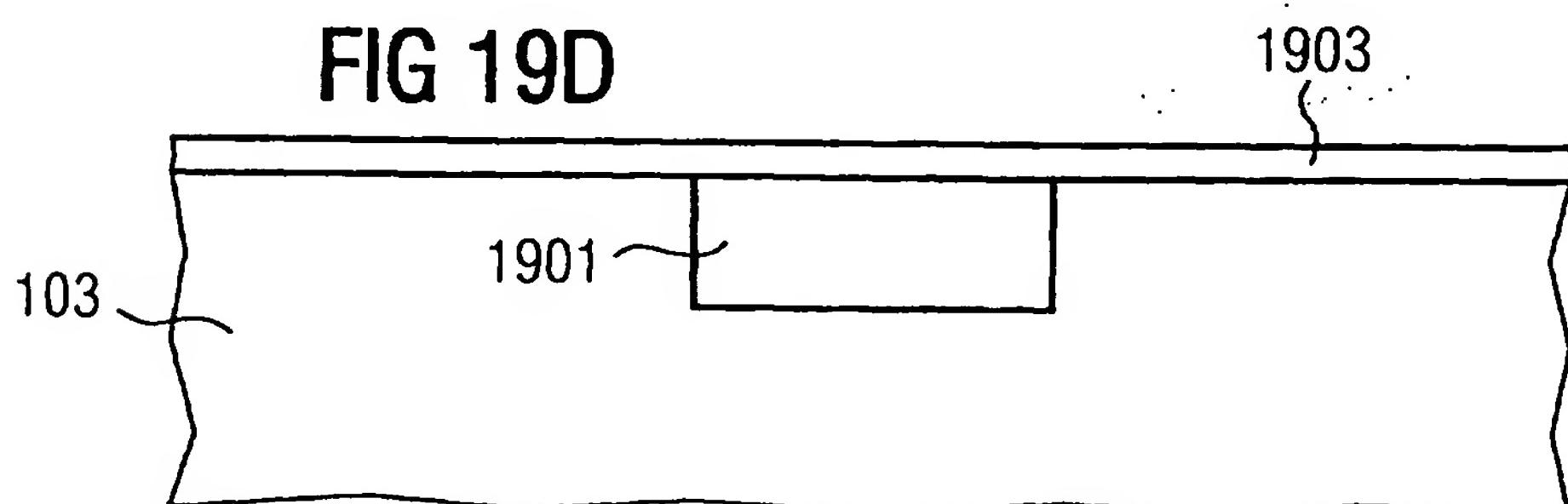
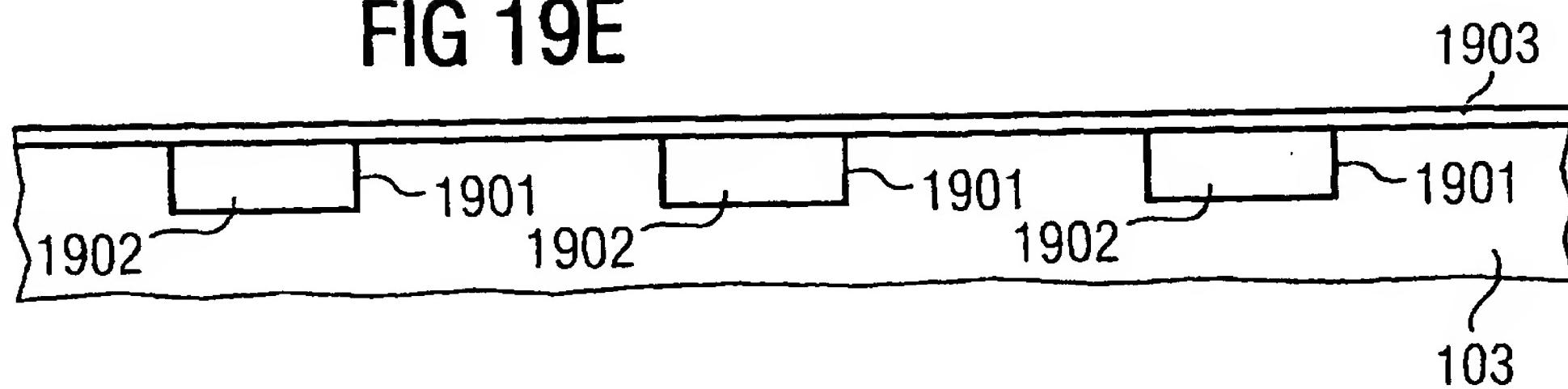
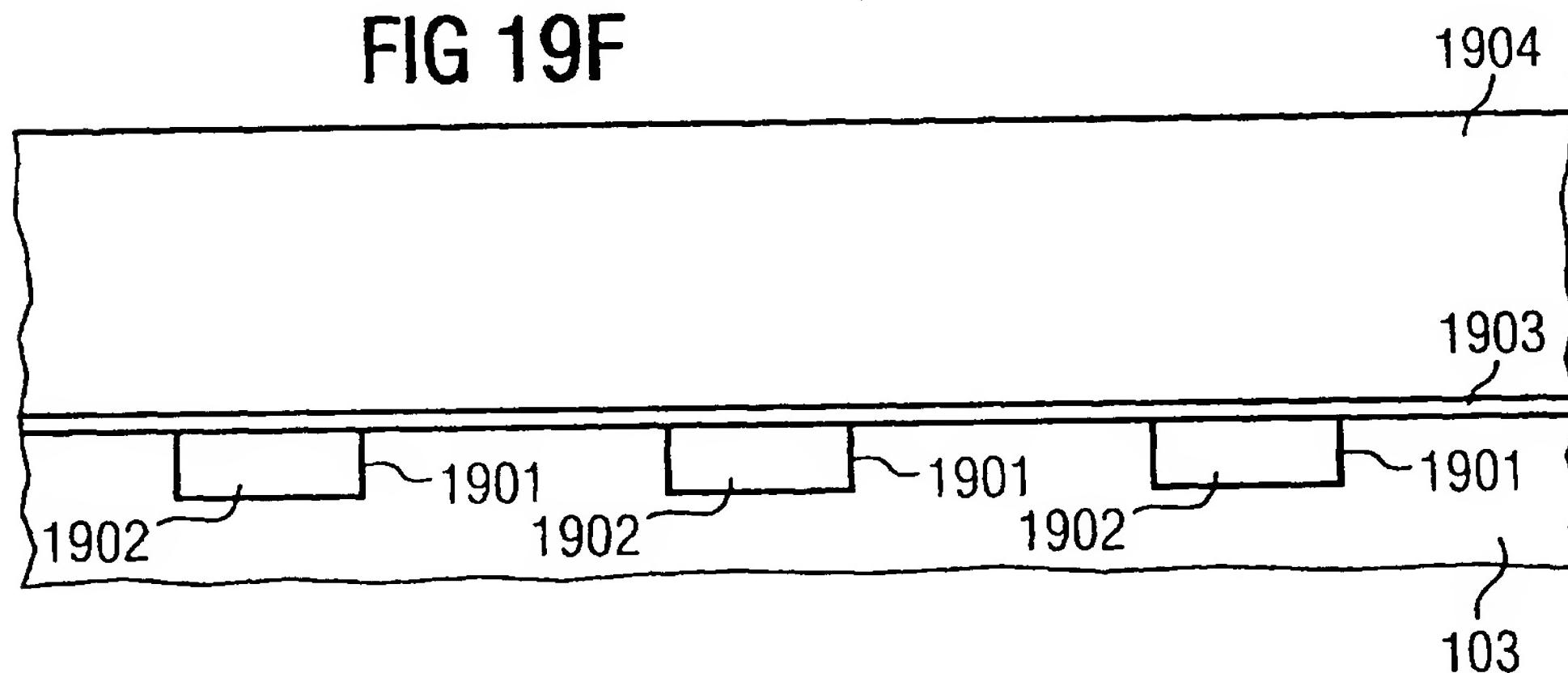
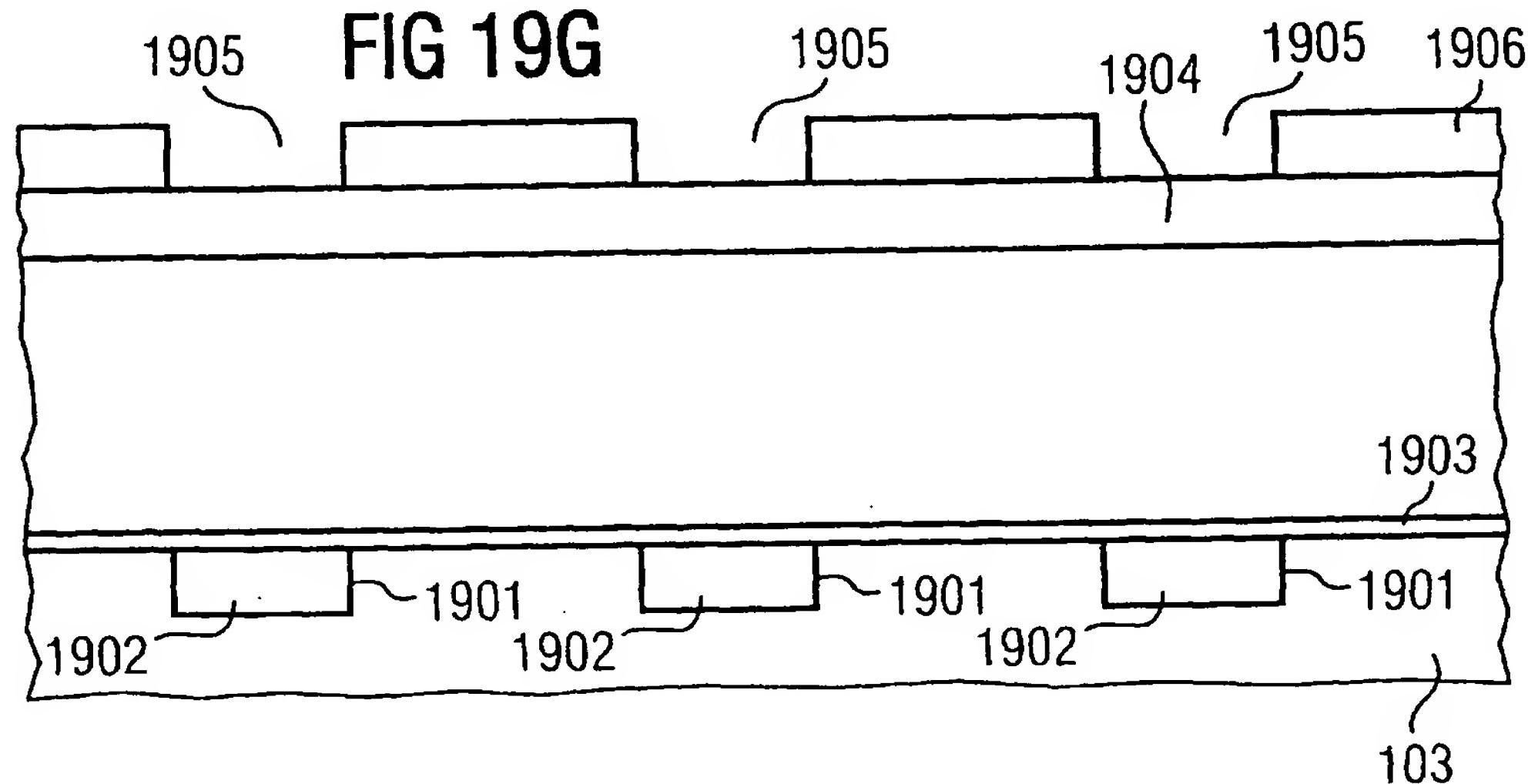


FIG 19E**FIG 19F****FIG 19G**

AN: PAT 2001-616690
TI: Biosensor chip, useful for detecting e.g. protein or nucleic acid, has two electrodes for performing reduction-oxidation recycling process and integrated differentiation circuit
PN: WO200175141-A2
PD: 11.10.2001
AB: NOVELTY - Biosensor chip (A) with an electrode (E1), comprising a region for retaining probes (I) able to bind to macromolecular biopolymers (II) and an electrode (E2), configured so that a reduction/oxidation recycling process can occur on them, is new. The chip has an integrated electrical differentiator circuit that detects the current generated during the process and differentiates it with respect to time.; USE - The chip is used to detect proteins, peptides and nucleic acids. ADVANTAGE - (A) provides reliable determination of the slope of the current/time plot generated during the redox process. On-chip differentiation is a more robust system than the conventional off-chip differentiation and the chip can provide quantitative information.
PA: (FREY/) FREY A; (INFN) INFINEON TECHNOLOGIES AG;
(THEW/) THEWES R;
IN: FREY A; THEWES R;
FA: WO200175141-A2 11.10.2001; US2004014054-A1 22.01.2004;
DE10015816-A1 18.10.2001; EP1272850-A2 08.01.2003;
JP2003529770-W 07.10.2003;
CO: AT; BE; CH; CY; DE; DK; EP; ES; FI; FR; GB; GR; IE; IT; JP;
LI; LU; MC; NL; PT; SE; TR; US; WO;
DN: JP; US;
DR: AT; BE; CH; CY; DE; DK; ES; FI; FR; GB; GR; IE; IT; LU; MC;
NL; PT; SE; TR; LI;
IC: B01L-003/00; C12M-001/00; C12M-001/34; C12N-015/09;
C12Q-001/00; C12Q-001/68; G01N-027/327; G01N-027/416;
G01N-033/483; G01N-033/53; G01N-033/543;
MC: B04-D01; B04-E01; B04-E05; B04-G01; B04-L01; B04-N04;
B05-A03B; B11-C07A; B11-C08B; B11-C08E3; B11-C08E5; B12-K04;
B12-K04F; D05-H09; D05-H10; D05-H12D1; S03-E03C1; S03-E14H5;
S03-E14H9;
DC: B04; D16; S03;
PR: DE1015816 30.03.2000;
FP: 11.10.2001
UP: 28.01.2004

THIS PAGE BLANK (USPTO)